



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

국문초록

## 항산화제가 사람치수세포 분화 및 mineral trioxide aggregate의 세포독성에 미치는 영향

서울대학교 대학원 치의과학과 치과생체재료과학 전공  
(지도교수 양 형 철)

김 영 석

치수세포 중 일부는 조상아세포로 분화가능하며, 삼차 상아질 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 삼차 상아질 형성은 치아우식 등 외부 자극에 의해 발생되며, 치수복조와 같은 치료에 의해 dentin bridge가 형성되는 과정도 삼차 상아질 형성으로 분류될 수 있다. 특히 dentin bridge의 형성은 치수보호에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어, 적용되는 생체재료의 생체적합성을 판단하는 기준이 되기도 한다.

본 논문의 첫 번째 목적은 치수세포 분화를 촉진하는 물질 발굴의 일환으로서 녹차와 적포도주에서 발견되는 플라보노이드인 epigallocatechin gallate (EGCG)의 사람 치수세포 (human dental pulp cell, HDPC) 분화에 대한 영향을 조사하였다. EGCG는 60  $\mu$ M 이상의 농도에서 HDPC를 5일 동안 배양 시, 세포의 성장을 저해하였다. 그러나, 10-30  $\mu$ M에서는 ALP 활성을 촉진하였으며, osteocalcin (OCN)과 dentin sialophosphoprotein (DSPP)의 mRNA 발현을 증가시켰다. 또한

ascorbic acid와 dexamethasone과 같은 분화촉진 인자가 없는 상태에서 세포외기질의 석회화를 촉진하였다. 그러므로 EGCG는 치수세포의 분화를 촉진하는 물질로 확인되었다. 또한 EGCG는 티타늄 disc 표면에서 아파타이트층에 성공적으로 고정되었으며, 배양액으로 용출됨을 알 수 있었다. 이는 EGCG의 다양한 적용 가능성을 보여주는 결과라 할 수 있다.

본 논문의 두 번째 목적은 치수복조 등에 사용되는 mineral trioxide aggregate (MTA)의 생체적합성에 미치는 항산화제의 영향을 평가하는 것이다. 위에서 언급한 EGCG는 비수용성으로서 본 연구에서는 수용성 항산화제인 N-acetylcysteine (NAC)을 사용하였다. MTA의 세포독성은 경화시간에 의존적이며, 경화시간이 길어질수록 세포독성이 감소하였다. MTA의 초기 세포독성은 NAC에 의해 줄어드는 경향을 보였다. MTA와 10 mM의 NAC을 포함한 MTA (NAC-MTA)를 rat의 피하에 2주간 이식하고 MTA의 주변조직을 관찰한 결과, MTA와 NAC-MTA 모두 만성 염증의 반응은 보이지 않았으며, 두 시편 모두 fibrous capsule이 형성되고, 림프구와 같은 염증세포들이 같은 정도로 발견되었다. 즉, 두 시편의 염증 반응의 차이는 거의 없었다. 따라서 MTA의 세포독성을 감소시키는 NAC의 효과는 in vivo에서는 확인할 수 없었다. 향후 이식부위와 기간을 고려한 다양한 in vivo 조건에서 MTA의 생체적합성 개선에 미치는 NAC의 효과를 평가할 필요가 있을 것으로 사료된다.

---

주요어: 치수세포, 조상아세포 분화, 항산화제, Epigallocatechin gallate, N-acetylcysteine, Mineral trioxide aggregate

학 번: 2012-31195

## 목 차

I . 서론	1
II . 사람치수세포 분화에 대한 Epigallocatechin gallate의 영향	
II -1. 서론	4
II -2. 연구 방법	7
II -3. 결과	11
II -4. 고찰	19
II -5. 결론	21
III . MTA 세포독성 및 조직적합성에 대한 N-acetylcysteine의 영향	
III -1. 서론	22
III -2. 연구 방법	25
III -3. 결과	29
III -4. 고찰	43
III -5. 결론	44
IV . 종합결론	45
참고문헌	46
Abstract	54

## List of Figures

<b>Figure 1-1.</b> Cell growth of HDPCs in the presence of EGCG --	12
<b>Figure 1-2.</b> ALP activities of HDPCs in the presence of EGCG.-	14
<b>Figure 1-3.</b> (A) mRNA expression of OCN and DSPP in EGCG-treated HDPCs. (B) Effect of EGCG on mineralization of HDPCs. -----	16
<b>Figure 1-4.</b> (A) Scanning electron microscopic view of titanium surface biomimetically coated with calcium phosphate. (B) ALP activities of HDPCs grown on titanium surfaces biomimetically coated with calcium phosphate and EGCG. -----	18
<b>Figure 2-1.</b> Cytotoxicity of MTA. MTA was hydrated for 0 (A), 6 (B) and 24 (C) hrs before the cytotoxicity test.-----	32
<b>Figure 2-2.</b> Cytotoxicity of NAC-MTA. MTA was hydrated for 6 (A) and 24 (B) hrs before the cytotoxicity test. -----	35
<b>Figure 2-3.</b> Rat tissue responses to MTA (A-F) and NAC-MTA (G-L). Magnification is 40X (A,C,E,G,I,K) and 100X (B,D,F,H,J,L). -----	42

## List of Tables

<b>Table 2-1.</b> Setting time and components of MTA products used in cytotoxicity tests -----	26
<b>Table 2-2.</b> Cytotoxicity evaluation index based on ISO 7405:2008 for agar diffusion test -----	28

## I. 서론

생체 내에서 산화스트레스는 다양한 경로를 통하여 발생하고, 각종 질병과 노화에 관련되어 있는 것으로 알려져 있으며, 산화스트레스를 억제하고 조절하기 위하여 항산화제가 이용되어 왔다. 현재까지 다양한 종류의 항산화제가 보고되어 왔으며, 이들은 주로 산화스트레스를 일으키는 활성산소종과 직접 반응하여 항산화 작용을 나타낸다. 반면 항산화 효과로 잘 알려져 있는 N-acetylcysteine (NAC)은 세포 내에 시스테인 (cysteine)을 공급하여, 항산화 생체분자인 글루타치온 (glutathione)의 생합성이 활발히 이루어지도록 하여 항산화 효과를 보인다 (Atkuri 등, 2007). 천연식물에 주로 존재하는 플라보노이드 계통의 물질은 항산화 활성을 통한 항염증 작용이 보고된 바 있다 (Nijveldt 등 2001). 이는 활성산소종과 염증발생의 관련성에 기인하는 것으로, 항산화물질의 국소적 적용의 유용성을 보여주는 것이라 할 수 있다. 플라보노이드는 항염증 작용과 더불어 항암, 항균, 골형성 촉진 등 다양한 약리작용이 보고되고 있으며, 이는 플라보노이드의 치과관련 질병에 대한 적용 가능성을 제시하는 것으로서, 다음과 같은 연구결과가 보고되었다. 즉, proanthocyanidin, naringin, quercetin은 인공적으로 형성한 치근우식의 재광화를 촉진하였으며 (Epasinghe 등, in press), quercetin은 손상된 치수 조직의 활성에 긍정적인 효과를 보여주었다 (Takahashi 등, 2015). 또한 1-methoxyfolicolinol, licorisoflavan A 등은 *streptococcus mutans*에 항균작용을 하였으며, luteolin과 fisetin은 사람치은섬유아세포의 lipopolysaccharide 유도 cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현을 저해하는 것으로 보고되었다 (Gutierrez-Venegas 와

Contreras-Sanchez, 2013). 녹차와 적포도주의 주요 플라보노이드 성분인 epigallocatechin-3-gallate (EGCG)는 구강 내 발생할 수 있는 질환과 관련된 다음의 연구가 보고된 바 있다. Jiao 등은 EGCG가 치과용 레진모노머의 세포독성을 감소시킬 수 있다고 주장하였으며 (Jiao 등, 2015), Lombadro Bedran 등은 EGCG가 치은상피세포와 치은섬유아세포의 lipopolysaccharide 유도 염증반응을 cranberry proanthocyanidin과 함께 억제한다고 보고하였다 (Lombadro Bedran 등, 2015). 그리고 EGCG가 포함된 glass ionomer cement는 *Streptococcus. mutans*에 대한 항균효과를 보임으로서, 치과재료와 함께 사용될 수 있음을 보여주었다 (Hu 등, 2013). EGCG는  $\alpha$ -tricalcium phosphate와 혼합되어 백서두개골 결손부의 골재생을 촉진하였으며 (Rodriguez 등, 2011), 이는 치과용 골이식재에도 적용 가능할 것으로 예측된다.

삼차 상아질은 치수 보호에 중요한 역할을 하며, 조상아세포에 의해 형성된다. 외부 자극에 의해 조상아세포가 파괴되거나 손상을 입을 경우 치수에 존재하는 줄기세포 등이 조상아세포로 분화하여 삼차 상아질을 형성하는 것으로 알려져 있다. 따라서 치수줄기세포의 조상아세포로의 분화는 치과임상에서 매우 중요한 역할을 하며, 분화 촉진을 위한 다양한 연구가 시도되어 왔다. 본 논문은 크게 두가지 주제로 구분되며, 첫째는 사람치수세포 분화에 대한 항산화 플라보노이드 EGCG의 영향과, 둘째, mineral trioxide aggregate (MTA)의 생체적합성에 대한 항산화제 NAC의 영향평가이다. EGCG는 항산화효과와 함께 이전의 연구에서 뼈형성을 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Song 등, 2014). 따라서 조골세포의 뼈형성 기전과 유사한 신호전달체계를 지닌

치수세포의 상아질 형성에도 EGCG가 촉진효과를 보일 것으로 기대하였으며, 본 연구에서는 사람치수세포의 alkaline phosphatase (ALP) 활성, 상아질 형성 관련 유전자의 mRNA 발현, 세포외기질의 석회화에 대한 EGCG의 영향을 조사하였다.

MTA는 생체적합성이 뛰어나고 임상에서 높은 성공률을 보이는 재료로 각광 받고 있다. MTA는 밀폐성이 우수하고, 경화 후 적절한 강도를 유지하여, 치수를 보호 할 뿐 아니라, 삼차 상아질 형성을 촉진하여, dentin bridge가 수산화칼슘과 달리 MTA 직하방에 발생하는 것으로 알려져 있다 (Aeinehchi 등, 2003). 그러나 in vitro 상에서 세포독성이 발생한다는 보고가 있으며 (Keiser 2000), in vivo 상에서 초기에 염증이 발생하는 것으로 보고된 바 있다 (Sumer 2006). 따라서 세포독성과 염증발생이 MTA의 생체적합성에 어떠한 영향을 주는 가에 대한 연구가 필요하며, 이의 결과는 MTA의 유용성을 더욱 증대시킬 것으로 판단된다. MTA의 세포독성의 기전은 아직 완전히 밝혀지지 않았다. Minamikawa 등은 MTA가 치수세포의 산화 스트레스를 초래한다고 하였으나 (Minamikawa 등, 2011), 산화 스트레스의 발생 원인은 현재까지 알려진 바 없다. 따라서 MTA와 항산화제의 조합은 in vitro 상에서 산화스트레스를 감소시켜 세포독성을 줄일 수 있을 것으로 예측된다. 본 연구에서는 항산화제로 자주 사용되고 있는 NAC과 MTA를 혼합하여, in vitro 및 in vivo 실험을 통해 세포독성 감소와 염증반응 정도를 평가하고자 하였다.



## II. 사람치수세포 분화에 대한 Epigallocatechin gallate의 영향

### II-1. 서론

외부로부터의 충격 및 세균 감염에 의한 충치 발생으로 인해 치수 (pulp)와 접촉하는 상아질 (dentin)이 손상되었을 경우, 삼차 상아질 형성 (tertiary dentinogenesis)이 발생한다. 형성된 삼차 상아질은 치수를 보호하고, 이차적인 감염을 억제함으로써 결과적으로 치아를 보호하는 역할을 하게 된다. 생활치수치료 (vital pulp therapy)에서 수산화칼슘 혹은 MTA와 같은 재료로 치수복조를 시행한 경우, 재료의 하방부에 dentin bridge가 형성되며 (Oguntebi 등, 1995; Min 등, 2008), 이는 삼차 상아질 형성과 유사한 과정으로 볼 수 있다. 치수 복조에서 dentin bridge의 형성은 임상적으로 긍정적인 예후를 예측할 수 있는 지표라 할 수 있으며, 치수복조를 위한 생체재료의 개발에 있어서 삼차 상아질 형성 촉진은 해당재료의 중요한 생물학적 성질로 받아들여진다. 따라서 삼차 상아질 형성의 기전에 대한 이해와, 이를 촉진하는 물질 및 재료의 개발은 치수 보호의 측면에서 매우 큰 비중을 차지한다. 최근에는 일반적인 치료 방법을 넘어서 조직공학을 이용한 상아질 재생에 대한 연구가 빈번히 보고되고 있으며 (Albuquerque 등, 2014), 삼차 상아질 형성 기전 및 이를 촉진하는 물질은 상아질 조직 재생 연구에 필수적이라 할 수 있다.

삼차 상아질 형성은, 상아질 및 치수의 손상 정도에 따라, 일차 조상아세포 (primary odontoblast) 혹은 이의 전구세포 (progenitor

cell)에 의한 것으로 알려져 있다 (Haniastuti 등, 2008). 일차 조상아세포는 반응상아질 형성에 관여하며, 조상아세포가 손상되었을 경우에는 전구세포의 동원 (recruitment), 분화, 상아질 생성 등의 과정을 거쳐 반응상아질 형성이 발생한다. 상아질에는 transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), bone morphogenic protein (BMP)과 같이 조상아세포의 상아질 분비를 촉진할 수 있는 성장인자가 존재하고 있는 것으로 알려져 있으며, 이들이 특정한 자극에 의해 상아질로부터 분리되어 조상아세포의 삼차 상아질 형성을 촉진한다고 보고되었다 (Finkelman 등, 1990; Bessho 등, 1991; Bègue-Kirn 등, 1992). 또한 이들 성장인자는 치수세포 (dental pulp cell)의 분화를 유도하고 경조직 형성을 촉진할 수 있으므로, 반응상아질 형성을 유도한다고 할 수 있으며 (Li 등, 2011; Qin 등, 2012), 다양한 동물실험에서 외인성 성장인자에 의한 반응상아질 형성이 관찰되었다 (Nakashima 등, 1994; Hwang 등, 2008; Li 등, 2014). 따라서 상아질 재생을 위한 성장인자의 적용 가능성 및 임상적 유용성은 이미 실험적으로 입증되었다고 할 수 있다. 그러나 이러한 가능성과 다양한 실험적 노력에도 불구하고, 높은 생산단가로 인한 제품개발의 미비, 예후에 대한 우려 등으로 인해 성장인자가 임상에서 적용된 예는 아직까지 거의 없는 실정이다. 특히 성장인자는 사용 전까지 생리활성의 유지를 위해 세심한 주의가 필요하며, 생체재료와 같이 사용할 경우 재료의 특성에 따라 실패할 가능성도 있다. 따라서 위에서 언급한 성장인자의 생리활성을 대신할 수 있는 저분자 물질이 실용적 대안이 될 수 있을 것으로 생각된다. 저분자 활성물질은 일반적으로 거대분자인 성장인자보다 화학적으로 안정적이며, 대량생산이 가능하여 경제적일 수 있다. 더욱이 활성이

발견된 물질에 대해서는 이의 유도체 검색을 통하여 더욱 활성이 높은 물질의 발굴로 이어지기도 한다. 본 연구에서는 생리활성을 지닌 저분자 물질 발굴의 일환으로서 사람치수세포의 분화에 대한 EGCG의 영향을 관찰하였다.

플라보노이드는 항산화 효과가 높은 식물의 이차 대사산물로서 다양한 만성질환에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. EGCG는 적포도주 및 녹차의 주된 폴리페놀계 플라보노이드로서 다양한 생물학적 시스템에서 강력한 항산화효과가 보고된 바 있다 (Li와 Xie, 2000). 한편 EGCG의 항산화 효과 이외에 골형성에 관련된 연구결과도 보고되었다. 우선 EGCG에 의한 파골세포의 세포사 유도와, 파골세포 성장과 분화에 대한 억제 효과가 관찰되었으며 (Nakagawa 등, 2002; Morinobu 등, 2008; Oka 등, 2012), 골다공증 백서 모델에서 골 소실의 제어가 보고되었다 (Song 등, 2014). 파골세포에 대한 영향과 함께, EGCG는 간엽줄기세포의 ALP 활성을 촉진하고, BMP-2, bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OCN), collagen I의 유전자 발현을 높이는 등, 골분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Jin 등, 2014). 또한 사람 osteoblast-like cell인 SaOS-2의 ALP 활성과 mineralized bone nodule의 형성을 in vitro에서 높이는 것으로 보고되었다 (Vali 등, 2007). 비록 EGCG가 파골세포와 조골세포에 미치는 영향에 대한 분자수준에서의 기전은 아직 밝혀지지 않았으나, 골다공증 및 골형성 부전에 대한 적용 가능성은 충분하다고 할 수 있다.

본 연구에서는 치수세포의 분화에 대한 EGCG의 영향을 조사하기 위하여 EGCG로 처리된 사람치수세포의 ALP 활성, OCN과 dentin sialophosphoprotein (DSPP) 유전자의 mRNA 발현, 세포외기질의

석회화를 관찰하였다. 또한 아파타이트와 EGCG의 응용 가능성을 보기 위하여, titanium (Ti) 디스크에 EGCG를 아파타이트와 같이 코팅하여 치수세포의 ALP 활성을 관찰하였다. 본 연구 결과를 통하여 치수세포의 재생 뿐 아니라, 임플란트 표면의 뼈형성 촉진을 위한 EGCG의 적용 가능성을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

## II-2. 연구 방법

### 재료

세포배양액과 우태혈청 (fetal bovine serum, FBS) 및 배양 관련 시약은 GIBCO-BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. 녹차로부터 추출된 EGCG를 포함한 다른 모든 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. EGCG는 10 mM의 농도로 dimethyl sulfoxide에 용해하여 -20°C에 stock solution으로 저장하고, 사용 전에 배양액으로 희석하여 세포를 처리하였다.

### 세포배양

사람 치수세포 (human dental pulp cell, HDPC)는 서울대학교 치과병원의 Institutional Review Board (CRI06015)의 승인 및 절차에 따라 교정환자에서 발치한 소구치로부터 이전과 같은 방법으로 얻었다 (Kim 등, 2010). 즉, 발치한 치아를 절개하여 얻은 치수를 잘게 조각낸 후, 20% FBS와 항생제가 포함된 (100 U/ml penicillin-G, 100 µg/ml streptomycin) Eagle's alpha minimum essential medium

( $\alpha$ -MEM)에서 37°C 및 humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>/95% air)의 조건으로 배양하였다. 조각난 치수조직이 culture well의 바닥에 부착이 용이하도록, 조직이 배양액에 약간 잠기는 정도를 유지하면서, 2일마다 배지를 교환하였다. 4주 후, 치수조직으로부터 나온 세포를 trypsin-EDTA로 분리하여  $\alpha$ -MEM으로 4세대까지 계대 배양하였다. 본 연구에서는 5세대 HDPC를 이용하였다.

### EGCG 세포독성시험

계대 배양한 HDPC를 6-well culture plate에 5000 cells/well의 농도로 넣은 후, 다양한 농도의 EGCG (0, 10, 30, 60  $\mu$ M)와 함께 배양하고, 9일까지의 세포성장을 측정하였다. 배지는 2일 마다 교환하였다. 측정을 위해 trypsin-EDTA로 분리한 세포를 배양액으로 세척하고 0.4% trypan blue 용액으로 염색하여 hemocytometer로 세포를 계수하였다.

### ALP 활성 측정

ALP 활성은 이전의 방법을 사용하였으며 (Lee 등, 2006), 간단히 서술하면 다음과 같다. 10<sup>4</sup>개의 HDPC를 96-well culture plate에 넣고, 100  $\mu$ l 배양액으로 배양하였다. 배양액은 성장배지 (basal medium, BM) 또는 분화배지 (differentiation medium, DM)을 사용하였으며, BM은  $\alpha$ -MEM을, DM은 25  $\mu$ g/ml L-ascorbic acid, 10 mM  $\beta$ -glycerol phosphate ( $\beta$ -GP), 10 nM dexamethasone이 포함된  $\alpha$ -MEM을 나타낸다. 배양 시 EGCG (5, 10, 15, 30  $\mu$ M)가 첨가된 배양액을 2일 마다 교환하였으며, ALP 활성 측정은 3일 간격으로

13일까지 수행하였다. EGCG가 포함되지 않은 배양액을 음성대조군으로 하였다. ALP 활성 측정을 위해 culture plate에서 분리한 세포를 0.05% Triton X-100이 포함된 phosphate-buffered saline (PBS)에 현탁하여, 상온에서 60초 동안 초음파 처리로 세포막을 파괴하고 cell lysate를 획득하였다. Cell lysate의 총 ALP를 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer (pH 10.3)에서 p-nitrophenyl phosphate와 상온반응 시켰다. 반응을 0.5 N NaOH로 종료시킨 후, 405 nm에서 microplate reader (Model 550, Bio-Rad, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 단백질 함량 측정은 bovine serum albumin을 표준시약으로 하여 Bradford법으로 수행하였다 (Bradford, 1976).

#### OCN과 DSPP 유전자의 mRNA 발현 측정

OCN과 DSPP 유전자의 mRNA 발현을 조사하기 위해 이전의 연구와 같이 역전사중합효소연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 이용하였다 (Kim 등, 2013). 우선 24-well culture plate의 각 well에  $5 \times 10^4$ 의 세포를 37°C 및 humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>/95% air)의 조건하에서 24시간 동안 전배양 한 후, 10  $\mu$ M EGCG가 포함된 신선배지로 교환하여 세포처리를 시작하였다. EGCG 처리 기간은 3, 5, 10, 15, 20, 25일로 하였으며, 2일마다 배지를 교환하였다. Total RNA를 TRIzol reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA)로 분리하고, SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen)을 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 사람 DSPP primer (forward 5'-CCTCGTCTTCATCCTCATCTG-3', reverse 5'-GGTGTCTCTGGTGCATGAAGGT -3')와 OCN primer

(forward 5'-CCTCAGTCCCCAGCCCAGATCC-3', reverse 5'-CAGGGCAGAGAGAG AGGAG-3')는 Bioneer (Deajeon, Korea)로부터 구입하였다. cDNA 합성은 50°C에서 30분간 하였으며, denaturation은 94°C에서 2분 수행하였다. PCR은 94°C에서 30초 (dissociation), 56°C에서 30초 (primer annealing), 72°C에서 1분 (extension)의 cycle로 35회 하였으며, primer extension을 위해 마지막으로 72°C에서 10분간 처리하였다. PCR 생성물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 분리하고, ethidium bromide로 염색하였다. GAPDH mRNA의 PCR 생성물은 전기영동의 표준으로 사용하였다.

#### Alizarin red S 염색

HDPC 세포외기질의 석회화에 대한 EGCG의 영향을 조사하기 위하여,  $10^5$ 개의 세포를 12-well culture plate의 각 well에 넣고, 25일간 배양하였다. 모든 배지는 10 mM  $\beta$ -GP를 포함하도록 하였고, EGCG는 10  $\mu$ M을 첨가하였다. 음성대조군으로는 10 mM  $\beta$ -GP만을 포함한 배지를 사용하였으며, 양성대조군은 10 nM dexamethasone이 첨가된 배지를 사용하였다. Alizarin red S 염색을 위해, 우선 세포를 PBS로 2번 세척하고, 50% ethanol로 10분 고정 후, 증류수로 5분간 수화하였다. 염색은 1% alizarin red S로 실온에서 3분간 수행하고, 염색 후 증류수와 70% ethanol로 세척하고 풍건하였다.

#### 생체모방형 아파타이트 코팅을 이용한 EGCG 고정 및 HDPC의 ALP활성 측정

Ti 디스크 (직경 10 mm, 두께 2 mm)의 생체모방형 아파타이트

코팅을 위하여 electron beam evaporation 법으로 calcium phosphate가 미리 코팅된 Ti 디스크를 사용하였다 (Li 등, 2008). 생체모방형 아파타이트 코팅을 위해 제공받은 Ti 디스크를 calcium chloride (100 mg/ml)가 포함된 PBS에 72시간 동안 상온 침지하여 아파타이트가 생성되도록 하였다. 표면의 아파타이트 생성은 주사형 전자현미경 (S-4700, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다. EGCG 고정을 위하여 PBS 침지 시, EGCG를 침지액에 포함시켰다. 대조군 제작을 위해서는 EGCG가 포함되어 있지 않은 PBS에 Ti 디스크를 침지하였다. 아파타이트 생성 후, 표면에 세포배양을 위해 디스크를 멸균 증류수로 3번 세척하고, 자연 건조시켜 사용하였다. Ti 디스크에 고정된 EGCG의 odontogenic 효과를 조사하기 위하여, HDPC를 Ti 디스크 위에서 7일간 배양한 후, Ti 디스크 표면에 부착한 세포의 ALP 활성을 측정하였다.

## 통계 분석

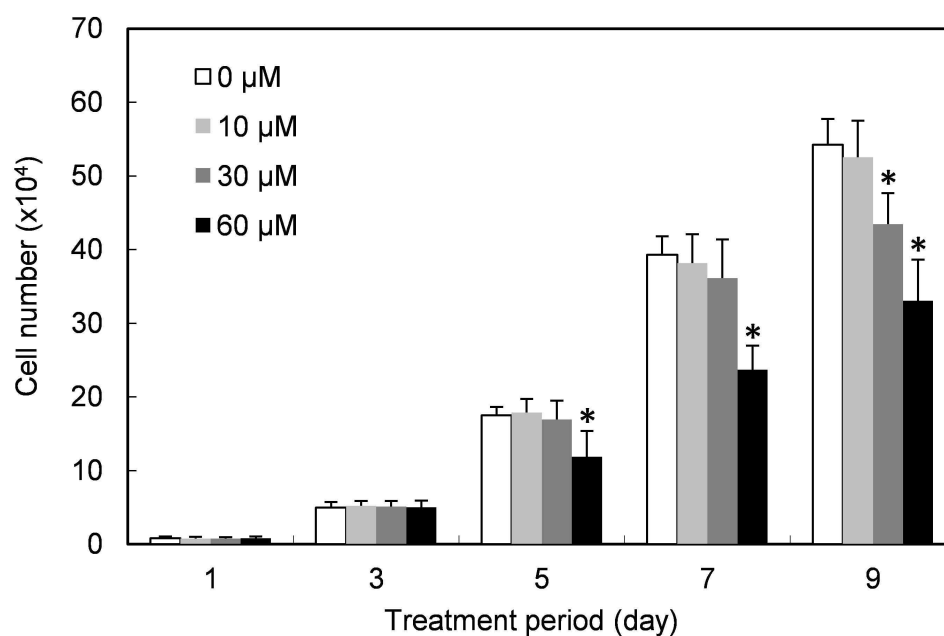
통계분석을 위하여 음성대조군과 시험군의 시험결과를 unpaired Student's t-test로 처리하여 분석하였다 ( $\alpha=0.05$ ).

## II-3. 결과

### HDPC의 세포성장 및 ALP 활성에 대한 EGCG의 영향

HDPC의 세포 성장에 대한 EGCG의 영향을 관찰하기 위하여 10-60  $\mu$ M EGCG로 9일 동안 처리한 세포를 2일마다 계수하였다. Fig. 1-1에 나타난 바와 같이, EGCG는 농도 의존적으로 세포 성장을 억제하였다. 최고농도인 60  $\mu$ M에서는, 음성대조군과 비교하여 5일째에 약 35%

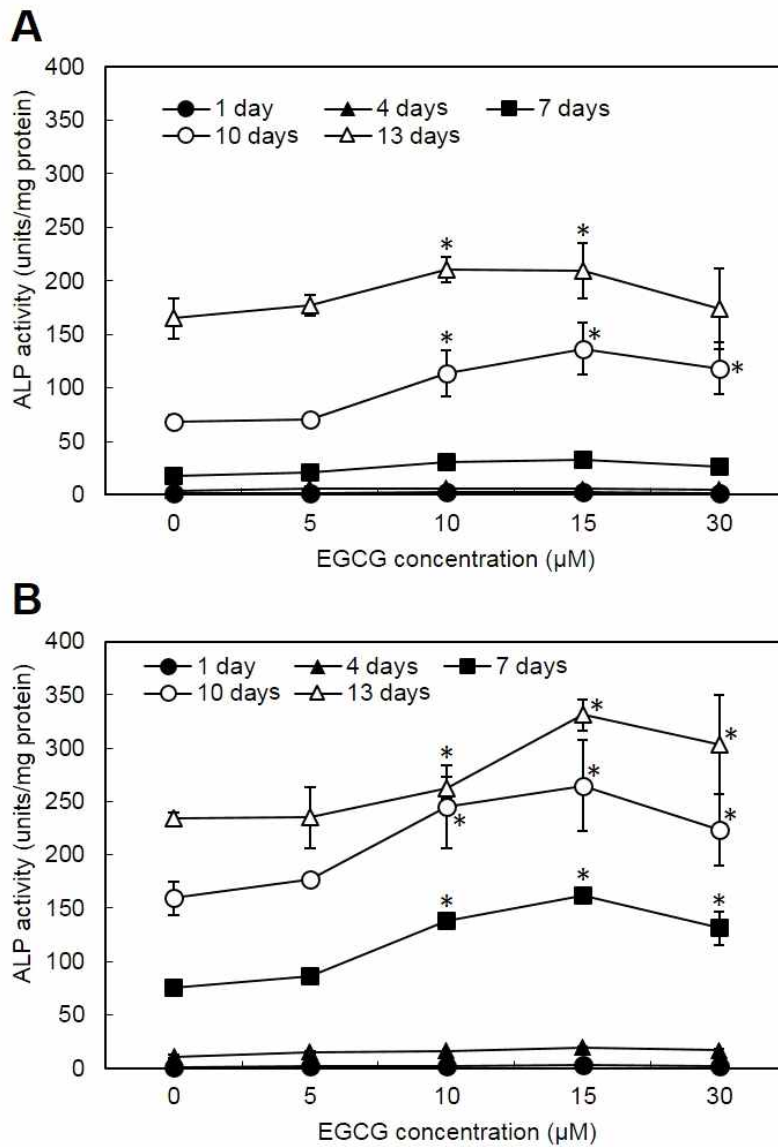




**Figure 1-1.** Cell growth of HDPCs in the presence of EGCG. HDPCs were treated with EGCG at various concentrations, and cell numbers were measured at intervals. Each data point represents the mean ( $\pm$  standard deviation) of triplicate experiments per condition. \* indicates a statistically significant difference compared to untreated control ( $p < 0.05$ ).

정도의 세포 수 감소가 있었으며, 30  $\mu$ M에서는 9일째에 음성대조군과 유의한 차이를 보였다. 10  $\mu$ M 에서만 9일 동안 세포성장을 저해하지 않았다.

ALP 활성화에 대한 EGCG의 영향을 관찰하기 위하여, HDPC를 13일 동안 5-30  $\mu$ M EGCG로 처리하였으며 3일 마다 ALP 활성을 측정하였다. 배양시간이 경과함에 따라 성장배지인 BM과 분화배지 DM 모두에서 음성대조군의 ALP 활성이 증가하였다 (Fig. 1-2). BM의 경우 7일까지는 ALP 활성의 증가가 미미하였으나, 그 이후에 큰 폭의 증가가 나타났으며, 13일에는 약 160 units/mg protein 정도의 활성을 보였다. DM의 음성대조군에서는 BM 음성대조군 보다 빠른 ALP 활성의 증가가 나타났으며, 7일과 13일에 각각 75 및 약 240 units/mg protein의 ALP 활성을 보였다. EGCG 처리에 의해 HDPC는 일정구간의 농도범위에서 EGCG 농도 의존적으로 ALP 활성의 증가를 보였다. BM에서는 배양 7일까지는 뚜렷한 EGCG의 효과가 보이지 않았으나, 10일째에 10과 15  $\mu$ M EGCG에 의해 농도 의존적 ALP 활성의 증가가 나타났다. 그러나 30  $\mu$ M에서 더 이상의 증가가 보이지 않았다. DM에서는 7일부터 EGCG (10, 15  $\mu$ M) 에 의해 농도 의존적 ALP 활성의 증가가 나타났으며, 13일째에서도 ALP활성이 증가하였다. 단, 30  $\mu$ M에서는 ALP 활성은 15  $\mu$ M EGCG 처리군보다 감소하는 경향을 보였다.

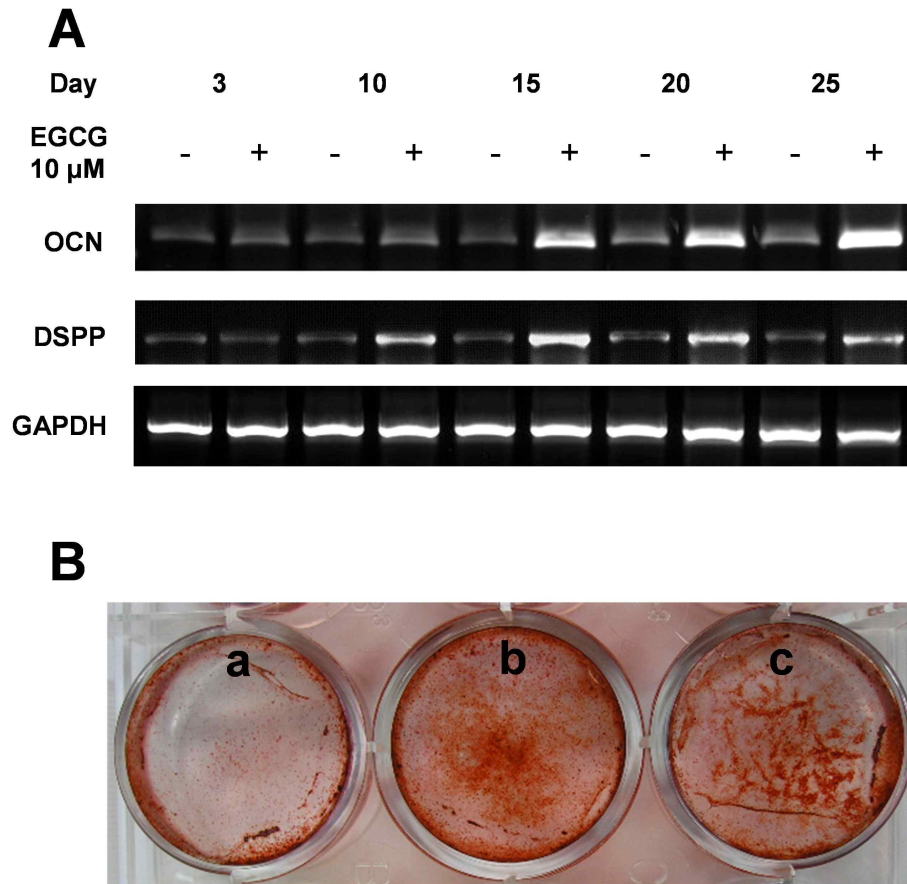


**Figure 1-2.** ALP activities of HDPCs in the presence of EGCG. HDPCs were grown in basal media (BM) (A) and differentiation media (DM) (B). ALP activity was measured at intervals. Each data point represents the mean ( $\pm$  standard deviation) of triplicate experiments per condition. \* indicates a statistically significant difference compared to untreated control ( $p < 0.05$ ).

### HDPC의 DSPP/OCN 유전자 발현 및 석회화에 대한 EGCG의 영향

HDPC의 DSPP와 OCN 유전자 발현에 대한 EGCG의 영향을 조사하기 위하여, 10  $\mu$ M EGCG로 HDPC를 처리하면서 유전자 발현의 변화를 시간별로 관찰하였다. OCN은 EGCG처리 15일부터 mRNA 발현이 증가하였으며, 25일까지 발현이 증가하였다 (Fig. 1-3A). DSPP의 경우 10일부터 mRNA 발현이 증가하였으며, 25일까지 증가된 발현이 유지되었다. 반면, EGCG로 처리하지 않은 대조군에서는 OCN와 DSPP의 유전자 발현이 증가하지 않았다.

음성대조군 ( $\beta$ -GP)은 매우 약한 정도의 석회화를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1-3B). 반면, 시험군 ( $\beta$ -GP + 10  $\mu$ M EGCG)과 양성대조군 ( $\beta$ -GP + 10 nM dexamethasone)에서는 뚜렷하게 많은 수의 mineralized nodule이 발생하였다.

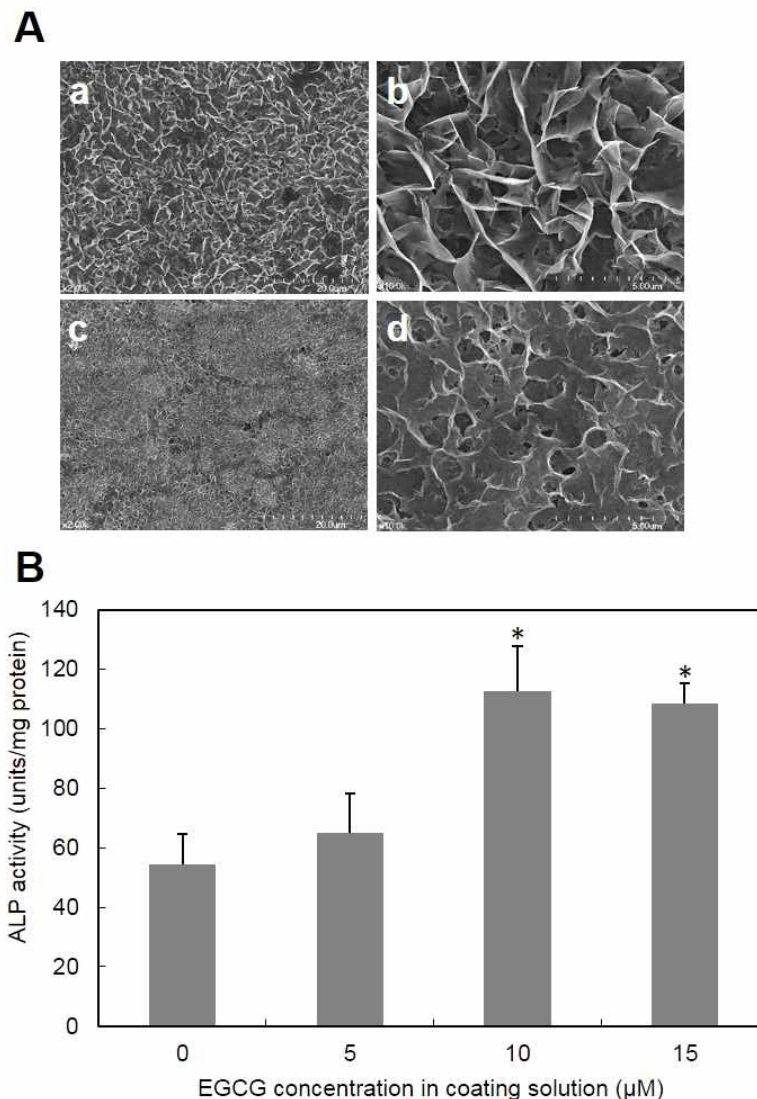


**Figure 1-3.** (A) mRNA expression of OCN and DSPP in EGCG-treated HDPCs. After culturing HDPCs with or without 10  $\mu$ M EGCG, mRNA expression of OCN and DSPP in HDPCs was analyzed with RT-PCR. GAPDH was used as a loading control. (B) Effect of EGCG on mineralization of HDPCs. HDPCs were grown in culture media containing  $\beta$ -GP only (a),  $\beta$ -GP + 10  $\mu$ M EGCG (b), and  $\beta$ -GP + 10 nM dexamethasone (c). Following a 25-day culture, the cells were stained with alizarin red S.

#### Ti 디스크 표면에 고정된 EGCG의 영향

Ti 디스크 표면에 EGCG를 고정하기 위하여 biomimetic apatite 코팅을 적용하였다. EGCG가 없는 환경에서 apatite 코팅된 Ti 디스크의 표면은 Fig. 1-4A의 a, b에서와 같이 얇은 조각이 붙어 있는 형상으로 전형적인 아파타이트 표면의 양상을 나타낸다. Biomimetic coating 시에 용액에 10  $\mu$ M EGCG를 포함시킨 경우에 Fig. 1-4A의 c, d에서 보이는 바와 같이 표면의 조각들의 크기가 작으며, 서로 붙어 있는 형태를 띠고 있다. 따라서 EGCG는 apatite 형성에 영향을 미치는 것으로 보인다.

Ti 디스크 위에 배양한 HDPC의 ALP 활성측정 결과, EGCG를 포함하지 않은 Ti에 비해 EGCG가 고정된 Ti에서 ALP 활성이 유의하게 높게 나타났다 (Fig. 1-4B).



**Figure 1-4.** (A) Scanning electron microscopic view of titanium surface biomimetically coated with calcium phosphate. The surface was coated with (c, d) or without (a, b) 10  $\mu\text{M}$  EGCG. (B) ALP activities of HDPCs grown on titanium surfaces biomimetically coated with calcium phosphate and EGCG. ALP activity was measured following a seven-day culture on the modified surface of the titanium. \* indicates a statistically significant difference compared to untreated control ( $p < 0.05$ ).

## II-4. 고찰

EGCG는 식물성 플라보노이드로서 항균성, 항진균성, 항산화능, 항염증 작용 등이 있는 것으로 알려져 있으며 (Caturla 등, 2003; Park 등, 2006; Liu 등, 2014), 최근에는 항암성이 보고되기도 하였다 (Zhao 등, 2015). EGCG는 고농도에서 암세포의 apoptosis를 유발하여 항암성을 보이는 것으로 알려져 있으므로 (Shen 등, 2014), 농도의 차이는 있을 수 있으나, 정상세포에서도 세포독성이 나타날 수 있다. 본 연구에서의 세포독성시험은 일반적으로 사용되는 배양시간보다 길게 하여 수행하였다. Fig. 1-1에서 나타난 바와 같이, 3일까지는 60  $\mu$ M에서 HDPC의 세포성장에 EGCG가 영향을 주지 않았으나, 5일째부터 높은 농도에서 영향을 미치지 시작하여, 9일째에는 30  $\mu$ M에서도 EGCG의 영향이 나타났다. 본 연구에서는 세포에 대한 영향이 자가사멸에 기인하는 것인지, 괴사와 관련된 것인지 조사하지 않았으나, 앞선 연구의 결과들로 미루어 보아, HDPC의 세포성장에 대한 EGCG의 저해는 apoptosis에 의한 것으로 예측된다. ALP 활성 측정의 경우에서도 EGCG의 세포독성이 고농도 (30  $\mu$ M)에서 영향을 주었을 것으로 판단된다. Fig. 1-2에서 보이는 바와 같이 ALP 활성이 EGCG 30  $\mu$ M에서는 더 이상의 증가를 보이지 않았으며, 이는 아마도 세포독성과 관련이 있을 것으로 판단된다. 세포독성이 나타나지 않는 농도에서는 HDPC의 분화를 EGCG가 유도하며, 이는 ALP 활성, 분화 유전자 발현, 석회화의 증가로 확인되었다. OCN은 조골세포의 분화에서도 발현이 강하게 나타나지만, DSPP는 조상아세포에서 비교적 특이적으로 발현하는 유전자이므로, 이의 발현은 EGCG가 치수세포의



odontoblastic 분화를 유도하는 증거라 할 수 있다. EGCG 처리에 의한 mineralized nodule의 생성은 10 nM dexamethasone과 유사한 정도의 결과를 보였으므로, EGCG의 분화촉진 효과는 매우 확실하다 할 수 있다. 이러한 EGCG의 분화촉진 효과에 관련된 세포신호전달 시스템은 아직 밝혀져 있지 않다. 단, 이전의 연구에서 EGCG와 같은 플라보노이드계의 quercetin이 extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway를 통해서 HDPC의 분화를 촉진하는 것으로 밝혀진 바 (Kim 등, 2013), EGCG 또한 같은 신호전달 체계로 분화를 촉진할 가능성이 크다.

임상에서 감염되지 않은 치수가 노출될 경우 상아질을 재생하는 것은 치아의 수명 연장에 중요한 수단이 될 수 있다. 따라서 이를 위한 생물학적 자극이 필요하며, 분화촉진 물질은 하나의 대안으로 고려될 수 있다. 물론 EGCG의 분화촉진 활성이 치수세포를 자극하여 노출된 치수를 보호하기에 충분한 것인가에 대해서는 더 많은 연구를 통해 조사할 필요가 있다. 또한 다른 생리활성물질과의 상승효과 등도 EGCG의 유용성을 높일 수 있으므로, 이에 대한 향후 연구가 필요하다 할 수 있다. 조직공학을 이용한 상아질 재생의 경우, 활성물질의 일환으로 EGCG와 같은 플라보노이드 물질의 적용도 가능성이 높을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 HDPC의 분화에 대한 EGCG의 영향과 함께, Ti 디스크 표면에 고정된 EGCG의 영향을 관찰하였다. 서론에서 언급한 바와 같이, HDPC가 Ti implant와 직접 접촉할 수 있는 임상적 환경은 없다고 할 수 있으나, HDPC와 조골세포의 유사성을 고려하면, 치과용 임플란트의 osseointegration 향상을 위한 EGCG의 적용을 기대할 수 있다. 즉,

EGCG가 포함된 아파타이트가 골형성을 촉진할 가능성을 보여주었으며, 골이식재 등에도 적용이 가능할 것으로 보인다.

## II-5. 결론

EGCG의 사람치수세포 성장 및 분화에 대한 영향은 다음과 같다.

- 1) 10  $\mu$ M EGCG는 HDPC의 성장에 영향을 주지 않으나, 60  $\mu$ M에서는 배양 5일부터 세포 성장을 억제하였다.
- 2) HDPC의 ALP 활성은 5-15  $\mu$ M에서 EGCG에 의해 증가하였으나 ( $p < 0.05$ ), 30  $\mu$ M에서는 더 이상의 ALP 활성의 증가가 나타나지 않았으며, 이는 고농도의 EGCG 세포독성에 기인하는 것으로 판단된다.
- 3) EGCG는 HDPC의 OCN, DSPP mRNA의 발현과 세포외기질의 석회화를 촉진하였다.
- 4) Ti 디스크 표면에 아파타이트와 같이 로딩된 EGCG는 HDPC세포의 분화를 촉진하였다.

이상의 결과, EGCG는 사람치수세포의 성장 및 분화에 영향을 주었으며, 임상적 사용에 대한 효용성을 검증하기 위해서는, 향후 동물실험을 통한 상아질 형성 촉진 효과에 관한 추가적인 평가가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

### III. MTA 세포독성 및 조직적합성에 대한 N-acetylcysteine의 영향

#### III-1. 서론

칼슘실리케이트계 치과용 충전재는 치아보존치료를 위해 치수복조, 근관충전, 치근단 역충전 등 다양한 용도로 사용되고 있으며, 대표적으로 gray MTA와 white MTA가 있다. Gray MTA는 정제된 포틀랜드 시멘트에 조영성을 부과하기 위해 bismuth oxide를 첨가한 것이며, white MTA는 석회시멘트에 실리카를 넣고 소성한 것으로 bismuth oxide도 포함되어 있다. 따라서 gray MTA와 white MTA는 원재료가 다르며, 색상의 차이는 주로 철분의 양에 기인하는 것으로 알려져 있다 (Song 등, 2006). 현재 다수의 외국 제조업체로부터 MTA가 생산, 판매되고 있으며, 국내에서는 white MTA 계열의 OrthoMTA (BioMTA, Seoul, Korea) 등이 시판되고 있다.

MTA는 물에 의해 수화됨으로써 경화가 이루어지며, 수화 전 주요 구성성분은 tricalcium silicate (53.1%)와 dicalcium silicate (22.5%)이며, bismuth oxide는 21.6% 정도를 포함하는 것으로 보고된 바 있다 (Camilleri 2008). 이 보고에 의하면, 수화된 후에는 tricalcium silicate와 dicalcium silicate가 각각 10.6%, 14.9%로 감소하며, calcium silicate hydrate가 생성되고 함량은 45.9%로 나타났다. 또한 calcium hydroxide가 수화과정에서 생성되었다. Calcium hydroxide는 강알칼리성을 유도하며, 이로 인해 물과 혼합된 MTA는 초기 pH가 약 10.2까지 상승하는 것으로 보고되었다 (Torabinejad 등, 1995). pH는

12.5까지 상승한 후, 점차적으로 감소하며, 급격한 pH의 상승은 구강 안에서 인접조직에 영향을 미칠 수 있을 것으로 판단된다.

구강조직에 대한 MTA의 영향을 조사하기 위해 다양한 연구가 수행되어 왔으며, 유전독성, 세포독성, 염증반응 등에 대한 이전의 연구로부터 MTA는 대체적으로 생체적합성이 우수한 것으로 인정되고 있다. 우선 Ames test에서 MTA 용출물은 돌연변이를 유발하지 않았으며 (Kettering 등, 1995), Chinese hamster ovary (CHO) 세포에서 유전자 변형을 초래하지 않았다 (Ribeiro 2006). 유전독성과 달리 세포독성에 대해서는 상이한 결과들이 보고되어 있다. Camargo 등은 white MTA와 gray MTA가 세포독성이 없다고 하였으며 (Camargo 등, 2009), Koulaouzidou 등은 시판되는 white MTA인 ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, Oklahoma, USA)가 세포활성을 경미하게 저해함을 보여주었다 (Koulaouzidou 등, 2008). 그러나 또 다른 연구에 의하면 경화초기의 MTA와 경화된 MTA가 세포독성에 차이를 나타냈으며, 경화초기 MTA에 의해 세포의 활성이 50% 이하로 감소되었다고 하였다 (Keiser 2000). 경화초기의 MTA가 일정 조건에서 세포독성을 나타낸 것은 앞서 기술한 바와 같이 pH의 변화, 즉 일시적으로 알칼리화된 배지에 의해 독성이 초래되었을 가능성이 크다. 이와 같이 MTA의 세포독성은 평가조건 및 환경에 따라 다르게 나타나므로, in vitro 결과로부터 in vivo에서의 세포독성을 예측하는 것이 용이하지 않다.

일반적으로 세포독성이 강한 물질이 생체조직과 접촉하면, 세포괴사 등을 유발하고, 종래에는 염증반응을 초래한다. 따라서 in vitro 상에서의 강한 세포독성으로부터 in vivo에서의 염증반응의 발생이

예측가능하다. MTA는 레진, 아말감에 비하여 세포독성이 약하다고 할 수 있으며 (Keiser 2000), 세포독성으로 인한 염증반응 또한 미미할 것으로 예측된다. MTA에 대한 염증반응 연구는 주로 동물 혹은 임상실험에서 치수복조를 통해 관찰되어 왔으며, 다수의 연구들이 유사한 결과를 보였다. 대체적으로 염증반응은 미약하며, MTA 직하방에 dentin bridge가 생성되었다고 하였다 (Faraco 등, 2001; Aeinehchi 등, 2003; Min 등, 2008). 이들 연구에서 치수조직의 관찰은 dentin bridge 생성을 판단하기 위해 시술 후 충분한 시간을 두고 수행되었다. 설치류의 결체조직에 MTA를 삽입하여 초기 염증반응을 관찰한 연구에서는 이식 후 15일에 매우 강한 염증반응을 보였으며, 30일에 염증이 약화되었다고 하였다 (Shahi 2006). 따라서 치아에서는 치수복조 후 초기 염증이 발생하며, 시간이 경과함에 따라 염증이 치유되고 경조직이 재생되는 것으로 판단된다. MTA의 초기 염증발생의 원인은 급격히 상승한 pH에 기인하는 것으로 예측되나, 이에 대한 직접적인 증거는 아직 제시되고 있지 않다. MTA가 우수한 생체적합성을 보이는 재료로 인식되고 있으나, 세포독성 및 염증반응을 더욱 낮추고자 하는 노력이 있어 왔다. 그 일환으로 MTA의 독성기전 연구에서, MTA가 설치류 치수세포의 활성산소를 증가시키고, MTA 표면에서 세포부착이 저해된다고 하였다 (Minamikawa 등, 2011). MTA에 의해 발생된 활성산소는 항산화제인 N-acetylcysteine (NAC)에 의해 제거되며, NAC이 MTA에 대한 세포부착을 증가시킨다고 하였다. 따라서 MTA에 의해 산화스트레스가 발생하며, 항산화제는 세포에 대한 MTA의 영향을 감소시키는 것으로 보인다. MTA에 의해 산화스트레스가 발생하는 원인은 아직 밝혀지지 않았으나,

항산화제를 적용하여 MTA의 생체적합성을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 맥락에서 본 연구에서는 항산화제인 NAC을 MTA와 혼합하여 MG63 골모유사세포 및 쥐의 피하조직에 미치는 영향을 보고자 하였다.

## III-2. 연구 방법

### 세포 배양 및 시약

세포 배양에 사용된 배지 및 시약은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. 특별히 언급되지 않은 시약은 Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### MTA 세포독성 시험

세포독성시험에 사용된 MTA는 ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, Oklahoma, USA), OrthoMTA (BioMTA, Seoul, Korea), MTA Angelus (Angelus, Londrina, PR, Brazil)이다. Table 2-1은 각 MTA의 경화시간과 성분 (Camilleri 등, 2013; Chang 등, 2011)을 나타낸다. MTA를 제조사의 지침에 따라 물과 혼합하여, 직경 5 mm, 두께 2 mm의 디스크형으로 제작하였다. 경화시간에 따른 세포독성의 차이를 보기 위하여 MTA를 물과 혼합 후, 0, 6, 24시간에 세포독성을 평가하였다.

세포독성은 한천확산법으로 수행하였다. 세포는 American Type Culture Collection CCL1 (NCTC clone 929, L929)을 사용하였다. 한천확산법은 ISO 7405:2008을 따라서 다음과 같이 수행하였다. 10%

**Table 2-1.** Setting time and components of MTA products used in cytotoxicity tests

ProRoot MTA (Dentsply)	OrthoMTA (BioMTA)	MTA Angelus (Angelus)
Setting time		
(reference)		
318 min (Kim 등, 2014)	324 min (Kim 등, 2014)	112 min (Khalil 등, 2015)
Components		
Tricalcium silicate	Tricalcium silicate	Tricalcium silicate
Dicalcium silicate	Dicalcium silicate	Dicalcium silicate
Tricalcium aluminate	Tricalcium aluminate	Tricalcium aluminate
Tetracalcium aluminoferrite	Tetracalcium aluminoferrite	Calcium oxide
Gypsum	Free calcium oxide	Bismuth oxide
Free calcium oxide	Bismuth oxide	Silicon dioxide
Bismuth oxide		Aluminium oxide

fetal bovine serum (FBS)를 포함한 Eagle's Basal Medium에 세포가  $1.3 \times 10^5$  cells/ml가 되도록 현탁하고 petridish에 분주하였다. 분주된 세포가 바닥 전체 면적의 80% 정도가 될 때까지 37°C, 포화습도, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 현미경으로 세포성장을 확인 후 배지를 제거하고, 3% 한천을 포함한 신선 배지를 첨가하였다.

한천 배지는 사용 전 45°C 수조에서 가온하여 사용하였다. 한천이 굳은 후, 음성대조군, 양성대조군, MTA 디스크를 한천배지 위에 위치하였다. 24시간 후 각 시료를 제거하고, 0.02% neutral red를 포함한 인산완충생리식염수 (PBS) 3 ml를 넣은 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 4시간 배양하였다. 4시간 후 PBS를 제거하고 현미경으로 세포의 형태 변형, 세포의 변성 등을 관찰하고 발생한 clear zone의 크기를 측정하였다. 세포독성의 평가는 ISO 7405:2008의 기준을 따라 수행하였다 (Table 2-2).

#### NAC-MTA 세포독성시험

NAC을 첨가한 MTA의 세포독성시험을 위해, ProRoot MTA와 혼합하는 물에 NAC을 용해시켜, NAC-MTA 디스크를 제작하였다. 사용된 NAC의 농도는 10, 20 mM로 하였다. NAC-MTA 디스크를 96-well plate에 넣고, MG63 osteosarcoma 세포가  $5 \times 10^5$ 의 농도로 희석된 세포 현탁액 150  $\mu$ l를 디스크 위에 분주하였다. 37°C, 포화습도, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 일정 시간 배양한 후, MTA 디스크를 WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfo-phenyl)-2H-

tetrazolium, monosodium salt]을 포함한 배지가 있는 well로 옮긴 후,



**Table 2-2.** Cytotoxicity evaluation index based on ISO 7405:2008 for agar diffusion test

Grade	Description	Interpretation
0	No detectable decolorization zone around or under specimen	Non cytotoxic
1	Decolorization zone limited to area under specimen	Mildly cytotoxic
2	Decolorization zone extends less than 0.5 cm beyond specimen	Moderately cytotoxic
3	Decolorization zone extends 0.5 cm to 1.0 cm beyond specimen	Moderately cytotoxic
4	Decolorization zone extends further than 1.0 cm beyond specimen but does not involve entire dish	Severely cytotoxic
5	Decolorization zone involves entire dish	Severely cytotoxic

1시간 동안 재배양 하였다. 재배양 후 450 nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다.

### NAC-MTA 랫드 이식시험

10 mM NAC 용액과 ProRoot MTA를 혼합하여 직경 2 mm, 길이 5 mm의 polyethylene tube에 넣은 후, 랫드의 등 부위 피하에 이식하였다. 대조군으로 NAC이 포함되어 있지 않은 MTA를 사용하였다. 랫드는 13주령 Sprague-Dawley (SD) 수컷 (300-350 g)을 사용하였으며, 서울대학교 실험동물윤리위원회의 승인 하에 시행하였다. 이식 후, 14일간 사육하고 희생시킨 다음, 이식 부위를 절개하고 10% 포르말데히드로 고정하였다. 조직학적 관찰을 위해, polyethylene tube를 세로 방향으로 5  $\mu$ m의 간격으로 절단하였다. 조직 절편을 헤마톡실린과 에오신으로 염색하고, 광학현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

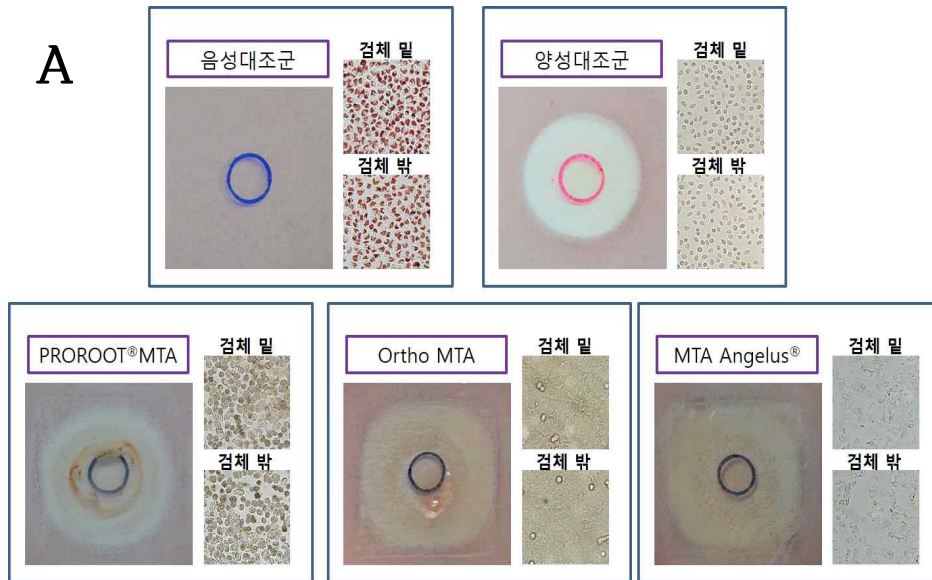
## III-3. 결과

### MTA 세포독성

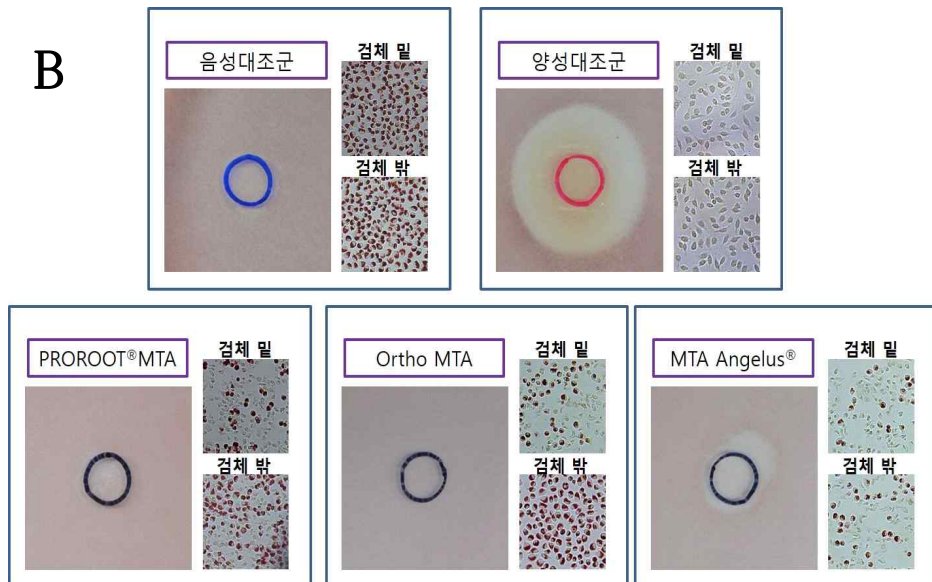
MTA 세포독성은 경화시간에 따른 변화를 관찰하였으며, 경화시간은 0, 6, 24시간으로 하였다. Fig. 2-2에서와 같이 음성대조군은 clear zone이 발생하지 않았으며, 양성대조군은 뚜렷한 clear zone이 나타났으며, 검체 밑과 밖에서 모두 세포의 활성이 사라졌다. 둥근 선으로 표시된 부분이 검체가 위치하였던 부분이다. 경화시간이 0시간인 경우, ProRoot MTA, OrthoMTA, MTA Angelus 모두 매우 넓은 clear

zone이 발생하였다 (Fig 2-1A). 즉 세포 사멸이 광범위하게 나타났다. 현미경 사진에서 알 수 있듯이 검체의 밑과 밖에서 neutral red 염색이 이루어지지 않았으며, 세포의 모양은 OrthoMTA와 MTA Angelus군에서 변형된 형태를 보였다. ProRoot MTA군은 neutral red가 염색되지 않았으나, 세포의 형상은 유지하고 있는 것으로 보였다. MTA를 6시간 경화 시킨 후, 세포독성을 관찰 한 결과 ProRoot MTA와 OrthoMTA의 밑 부분에서는 세포가 사멸하였으나, 검체 밖의 세포는 neutral red로 염색되어 있었다. 즉 세포가 활성을 유지하였다 (Fig. 2-1B). 그러나, MTA Angelus는 검체 밖의 세포도 사멸되었다. MTA를 24 시간 경화 시킨 경우, 3가지 MTA 모두 같은 반응을 보였다. 검체 밑에서는 세포 사멸이 발생하였고, 검체 밖의 세포는 활성을 유지하였다 (Fig. 2-1C).

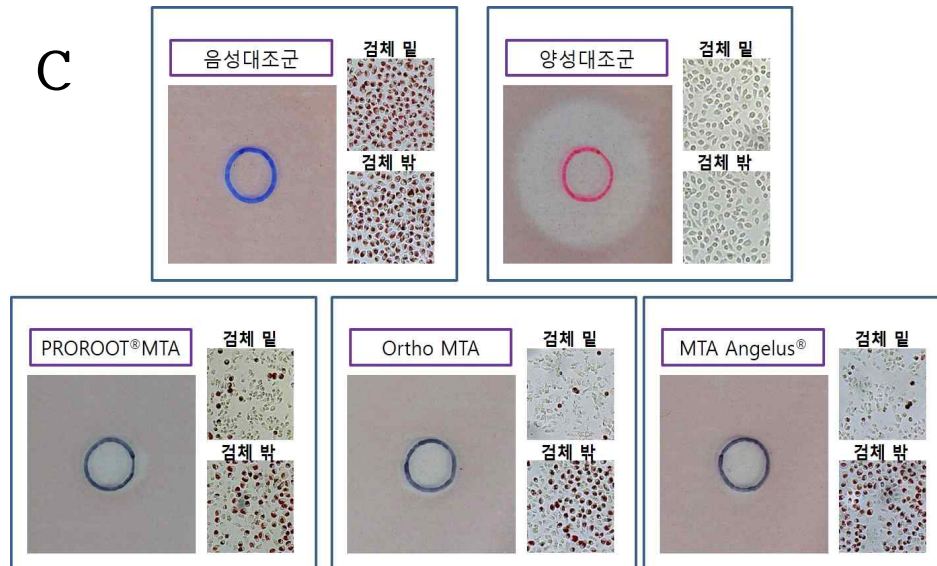
A



B



C



**Figure 2-1.** Cytotoxicity of MTA. MTA was hydrated for 0 (A), 6 (B) and 24 (C) hrs before the cytotoxicity test.

### NAC-MTA 세포독성

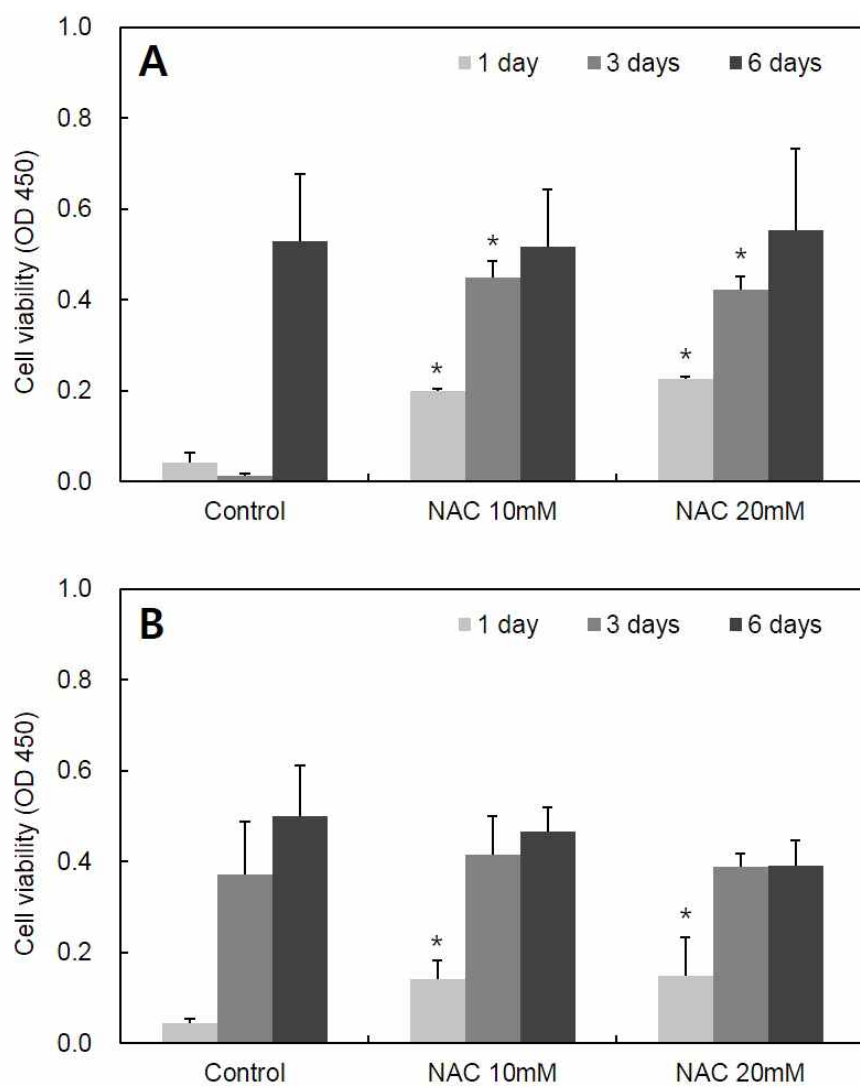
NAC-MTA 세포독성은 MTA를 6시간, 24시간 수화 (경화) 시킨 시료를 사용하였다. 우선 6시간 경화한 경우, Fig. 2-2A에서와 같이 NAC이 없는 경우 1일과 3일에서 세포활성이 거의 나타나지 않았으나, 6일에는 세포의 증가가 나타났다. 따라서 초기 세포활성이 보이지 않는 것은 세포의 활성이 저해된 것이며, 세포가 완전히 사멸한 것은 아닌 것으로 판단된다.

NAC 10, 20 mM이 첨가된 MTA는 NAC이 없는 MTA에 비교하여, 1일과 3일에 세포활성의 크게 증가하였다. 그러나 6일에는 모두 유사한 정도의 세포활성을 나타냈다 (Fig. 2-2A). MTA를 24시간 경화시킨 후에 세포독성을 측정한 결과, 1일에는 NAC을 포함한 MTA가 NAC이 없는 MTA보다 높은 세포활성을 나타냈으나, 3일과 6일에서는 모두 유사한 세포활성을 보였다 (Fig. 2-2B).

### MTA 조직 반응

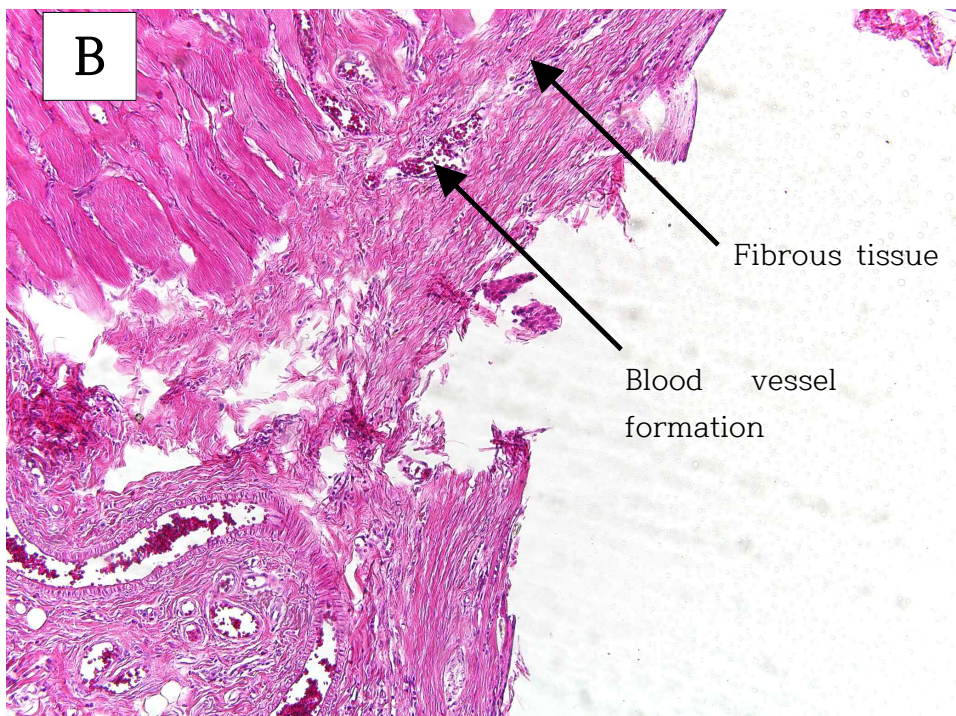
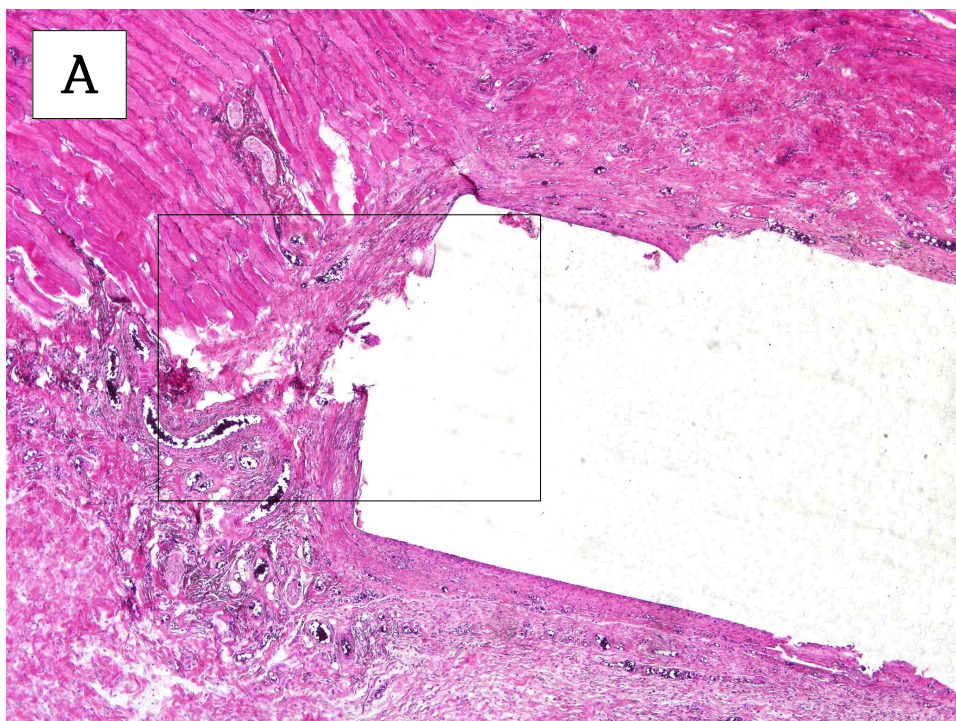
MTA와 NAC을 포함한 MTA에 대한 쥐의 피하조직의 반응을 관찰하였다. Fig. 2-3은 MTA, NAC-MTA 각각 3개의 시료에 대한 결과이다. 조직은 MTA와 직접 접촉하는 부위와 polyethylene tube wall와 접촉하는 부위가 있으며, MTA와 접촉하는 부분을 40배와 100배로 관찰하였다. 조직절편의 분석 결과, MTA 주변은 주로 fibrous capsule로 둘러싸여져 있으며, 림프구로 보이는 염증세포가 자주 관찰되었다. 만성 염증반응에서 나타나는 이물거대세포 (foreign body giant cell)는 거의 나타나지 않았다. 따라서 이식 초기에 염증반응이 발생하고, 치유되는 과정으로 판단된다. NAC-MTA 또한 MTA와 크게

다르지 않으며, 염증반응에 수반되는 neovascularization이 NAC-MTA 주변에서 종종 관찰되었다. 따라서 MTA와 NAC-MTA는 쥐의 피하조직에서 유사한 조직 반응을 유도하는 것으로 보인다.

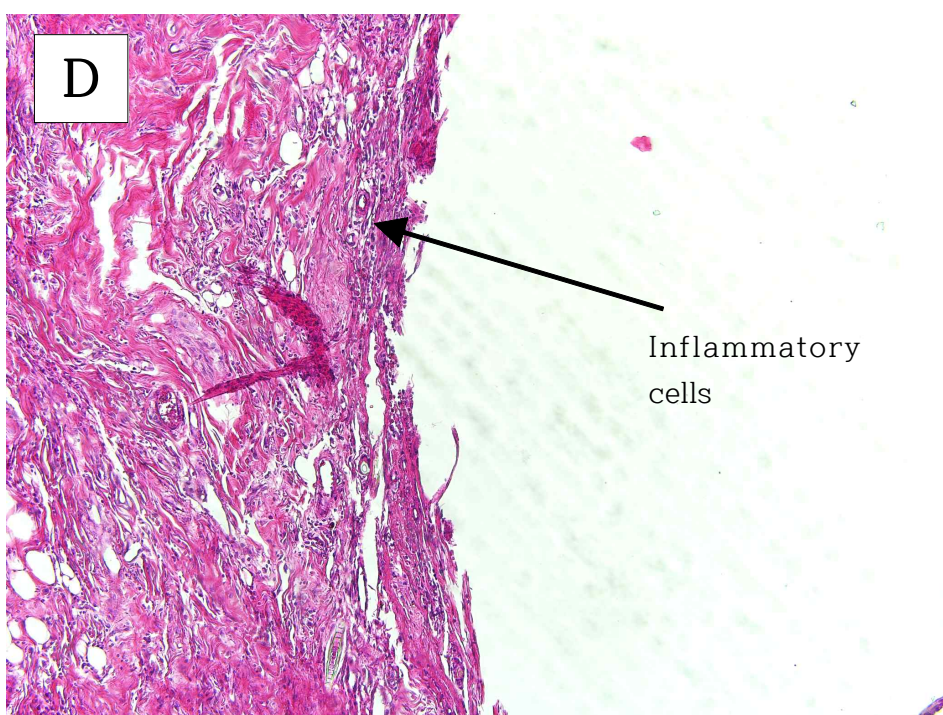
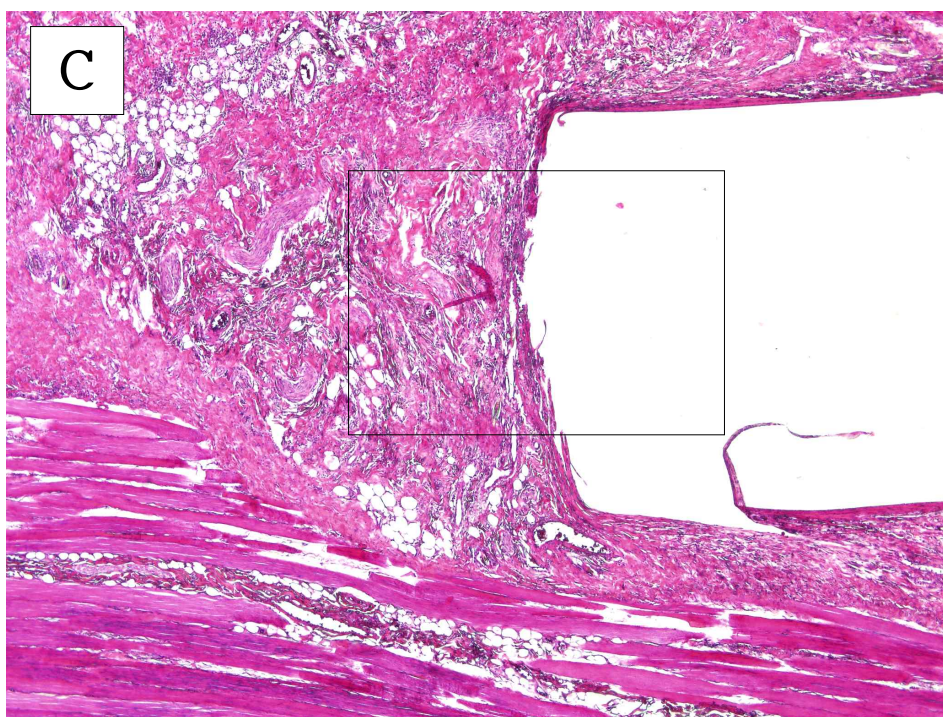


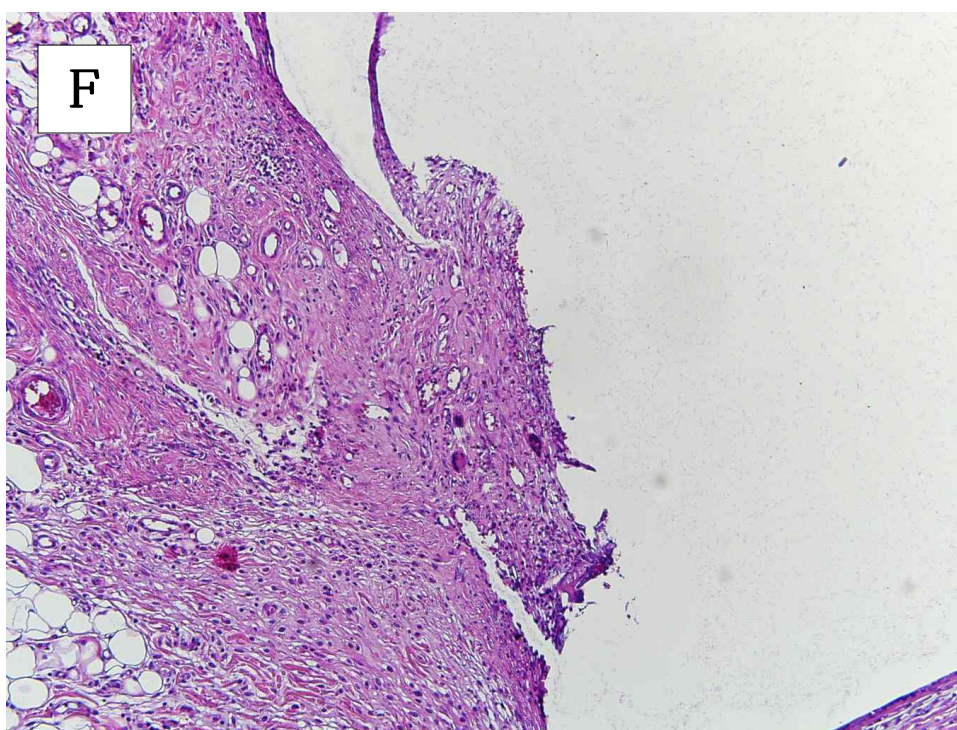
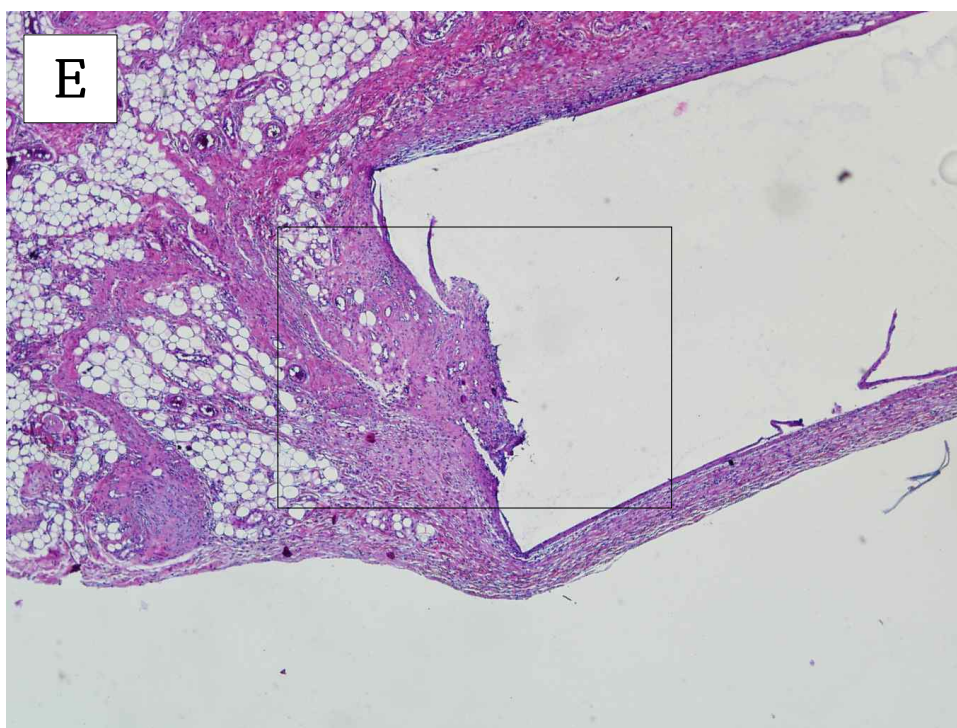
**Figure 2-2.** Cytotoxicity of NAC-MTA. MTA was hydrated for 6 (A) and 24 (B) hrs before cytotoxicity test. \* indicates a statistically significant difference compared to control ( $p < 0.05$ ).



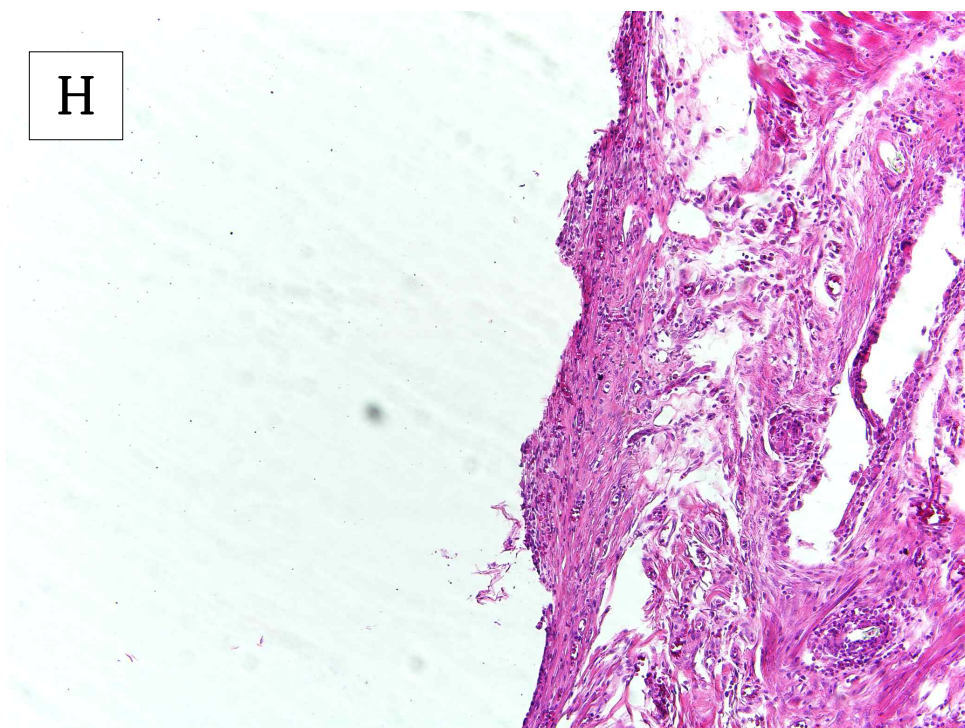
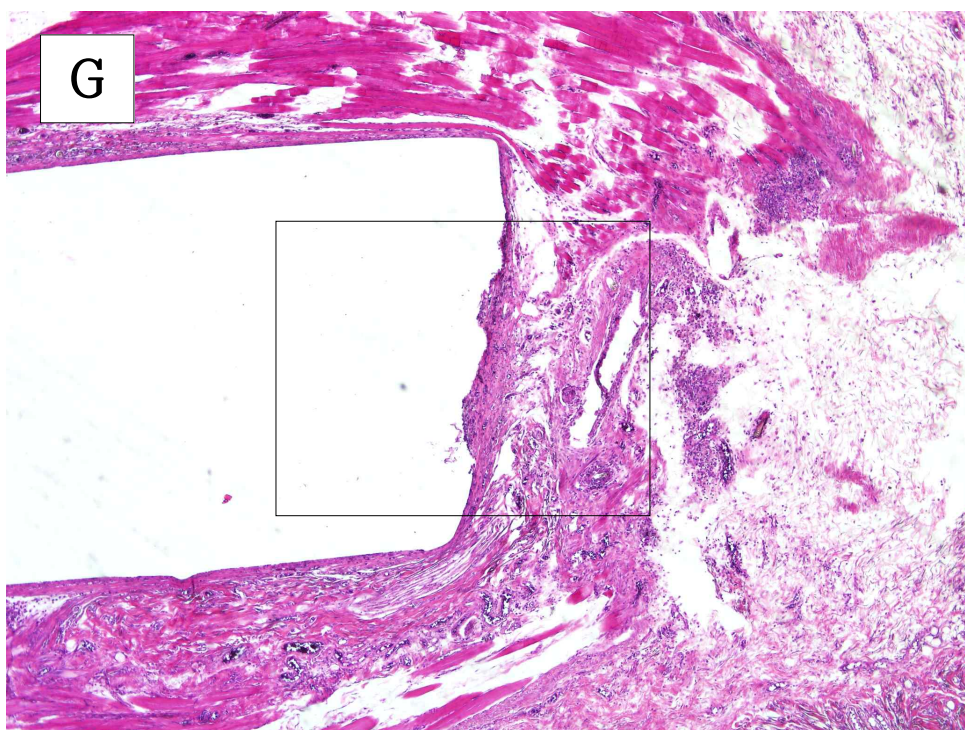




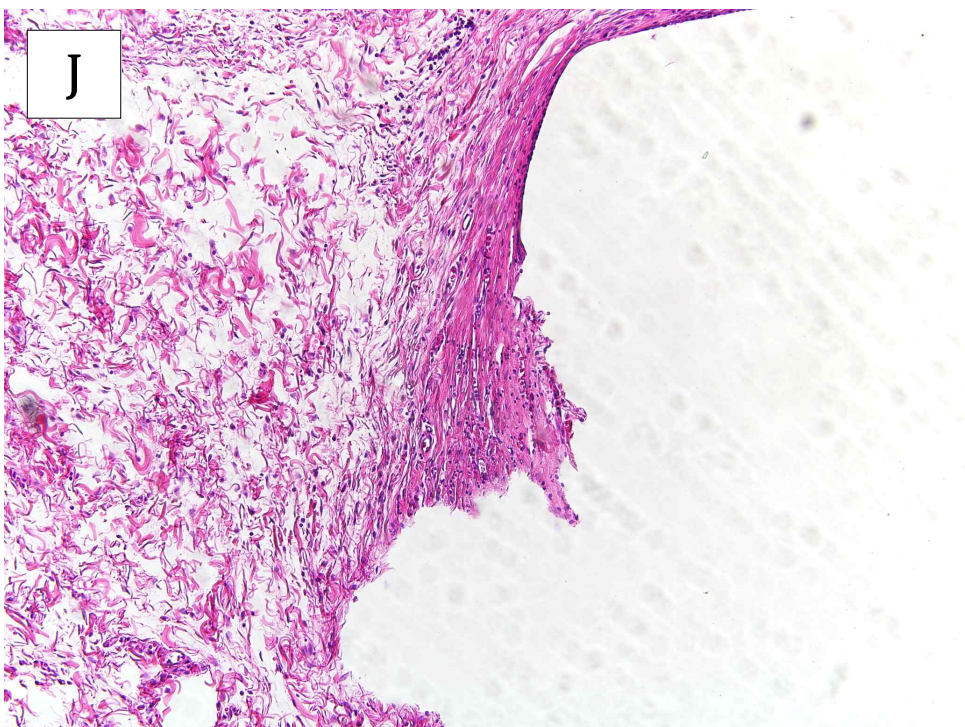
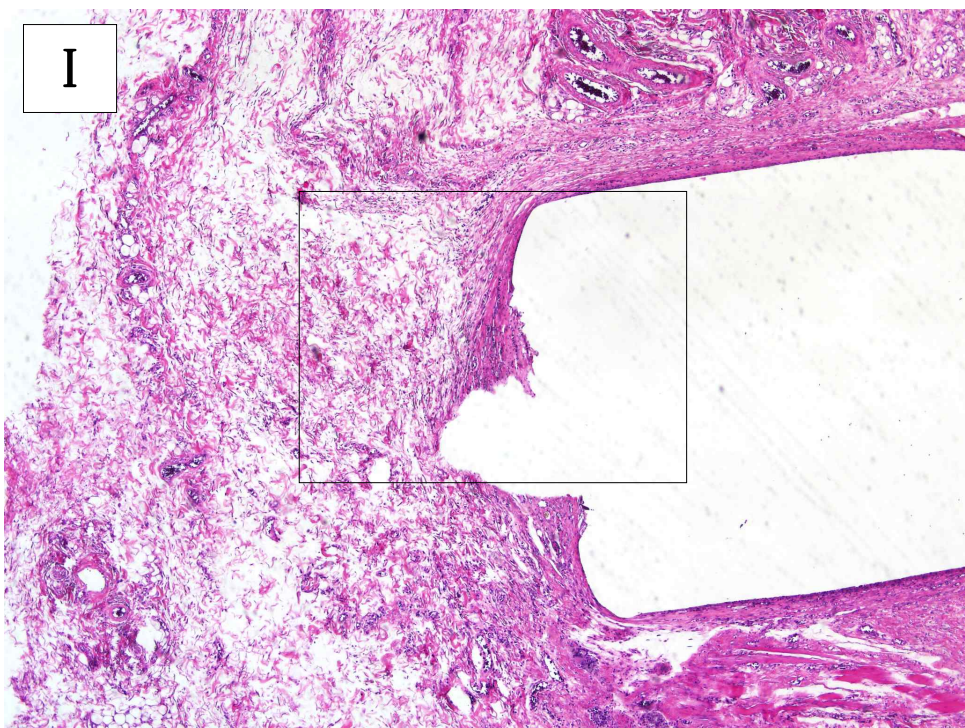




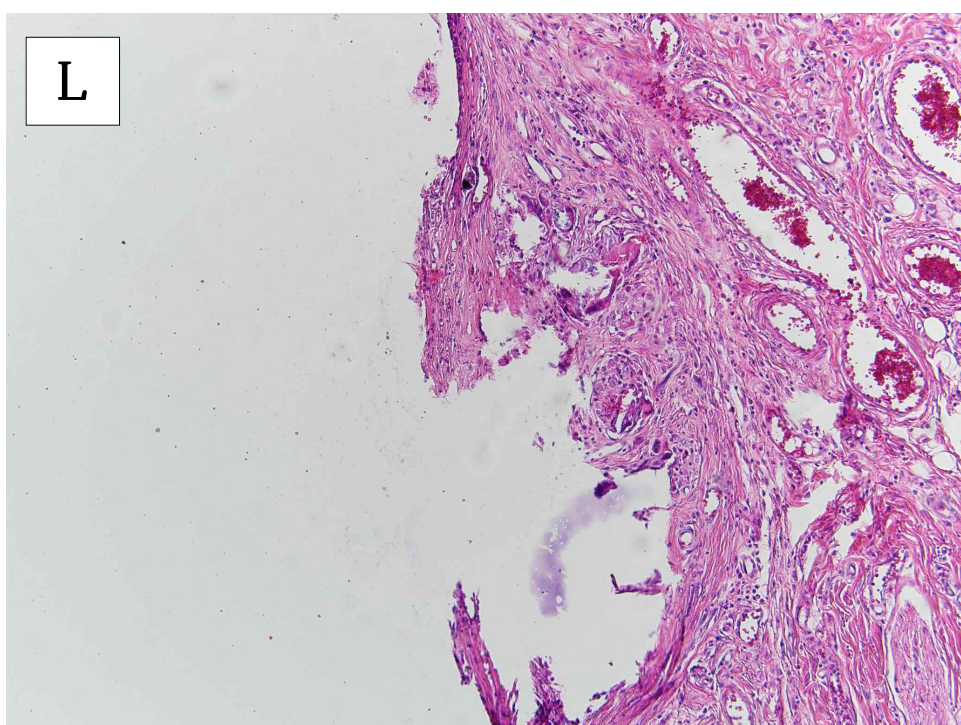
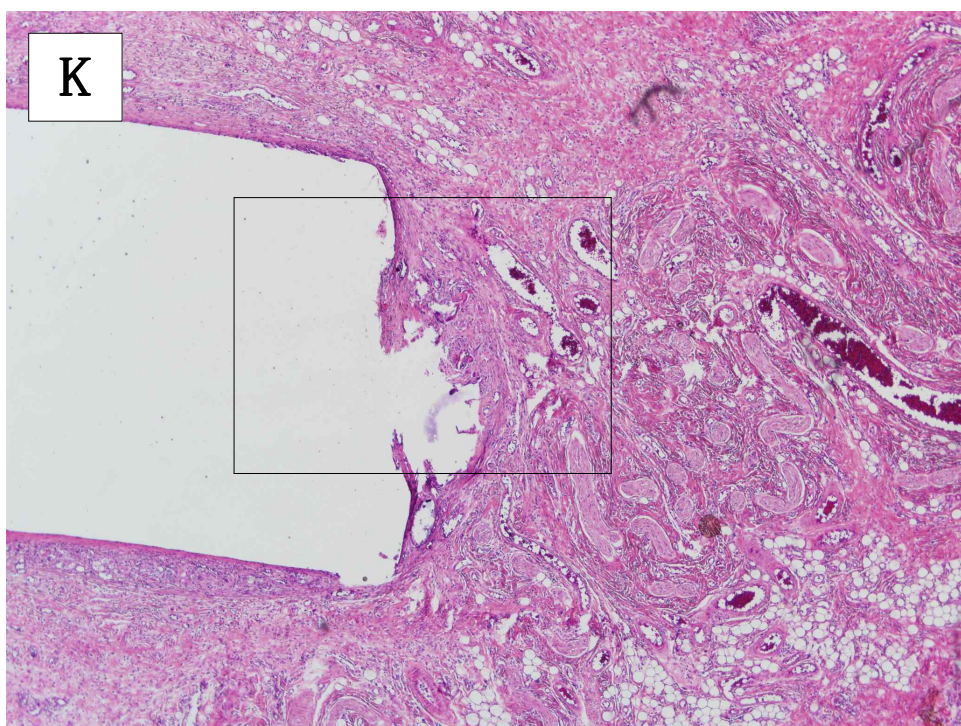












**Figure 2-3.** Rat tissue responses to MTA (A-F) and NAC-MTA (G-L). Magnification is 40X (A,C,E,G,I,K) and 100X (B,D,F,H,J,L). The area surrounded by lines in 40X photographs indicate magnified area in 100X photographs.

### III-4. 고찰

MTA의 세포독성은 경화정도 또는 경화시간에 따라 결과가 다르게 나타났다 (Fig. 2-1). 경화되지 않은 ProRoot MTA, OrthoMTA, MTA Angelus는 모두 양성대조군보다도 더 넓은 범위의 세포독성을 보였다 (Fig. 2-1A). 그러나 경화시간을 6시간과 24시간으로 하여, 세포독성을 관찰한 결과 독성은 확연히 감소되었다. 즉, MTA는 경화 전 혹은 경화 중에 세포독성을 야기하는 것으로 보인다. 이러한 결과는 임상에서 MTA로 치수복조 혹은 역충전을 수행할 경우, MTA가 경화가 이루어지기 전에 접촉하고 있는 치수 및 뼈에 영향을 줄 수 있음을 제시한다. 그러나 초기 조직반응이 결과적으로 주변조직에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 충분이 이루어져 있지 않다. 따라서 초기의 세포독성을 NAC으로 완화하여 조직의 반응을 보고자 하였다. Fig. 2-2는 항산화제인 NAC이 MTA의 세포독성을 감소시키는 효과를 보여준다. NAC의 효과는 24시간 경화보다는 6시간 경화에서 더욱 명확히 나타난다. 이는 Fig. 2-1에서와 같이 경화초기의 세포독성이 강하기 때문에, NAC의 효과가 더욱 뚜렷하게 나타난 결과라 할 수 있다. NAC의 방출 속도는 본 연구에 측정하지 않았으나, MTA의 초기 세포독성이 NAC에 의해 감소되었으므로, NAC의 방출은 주로 초기 수 시간에 일어나는 것으로 예측된다. Minamikawa 등이 (Minamikawa 등, 2011) 주장한 데로 MTA가 세포에서 산화독성을 발생시킨다면, 세포독성에 대한 NAC의 보호작용은 항산화 효과에 기인한다고 할 수 있다. 즉, MTA가 세포내 주요 항산화물질인 글루타치온을 제거하여 산화스트레스에 의한 세포독성을 야기하고, NAC은 글루타치온의



전구체인 시스테인을 공급하여, 글루타치온 농도 감소에 의한 세포독성 발생을 억제할 수 있다. NAC의 보호효과에 대한 기전은 향후 더 많은 연구가 필요하며, 본 연구에서는 NAC이 *in vitro*에서 MTA 초기 세포독성을 완화하는 것으로서 목적을 달성하였고 할 수 있다.

MTA 초기 세포독성이 조직에 미치는 영향을 보기 위하여 NAC-MTA의 조직 반응을 관찰하였다. *In vitro*의 결과에서 NAC이 세포독성 보호효과를 나타내었으므로, 동물실험에서도 유사한 효과를 기대하였다. 그러나 MTA와 NAC-MTA는 주변조직에 대하여 유사한 염증반응을 초래하였다. 약간의 fibrous capsulation과 염증세포의 출현이 MTA와 NAC-MTA 모두에서 나타났으며, 만성 염증에서 나타나는 반응은 발생하지 않았다. 본 결과는 2주간 관찰한 것으로, 만성 염증 반응의 차이를 보고자 하였으며, MTA 자체가 만성 염증 반응을 보이지 않음으로서 실질적인 NAC의 효과를 판단할 수 없었다.

### III-5. 결론

MTA의 세포독성은 경화시간에 의존하며, 경화시간이 길어질수록 세포독성이 감소하였다. MTA의 초기 세포독성은 항산화제 NAC에 의해 완화되었다. 동물실험에서 MTA는 fibrous capsule을 형성하고, 경미한 염증반응을 유도하였으며, NAC이 첨가된 MTA도 이와 유사한 조직 반응을 초래하였다. 추후 MTA의 *in vitro* 세포독성에 대한 NAC의 효과가 항산화 효과에 기인한 것인가에 대한 규명이 필요하다.

## IV. 종합결론

본 연구에서는 치아 상아질 재생을 목적으로 하여, 저분자 화합물의 적용 가능성과, 현재 사용되고 있는 치수복조제의 개선 가능성에 대하여 연구 및 고찰을 수행하였다. 플라보노이드는 항산화, 항염증, 항균 작용 등을 지닌 다양한 물질이 발견되어 왔으나, 아직까지 치과 임상에 적용된 예는 없다. 특히 EGCG의 경우, 항산화 작용이 매우 뛰어난 것으로 알려져 있을 뿐 아니라, 골 조직 형성에도 긍정적인 효과가 나타나는 것으로 보고되었다. 상아질 재생에 대한 효과는 본 연구에서 처음으로 발견되었으며, 항염증 작용과 함께 치수 치료에 매우 유용할 것으로 예측된다. MTA는 현재까지 개발된 재료 중에서 가장 생체적합성이 뛰어난 물질 중의 하나로 인식되어 왔다. 그러나 *in vitro*상에서 발생하는 MTA 세포독성이 실제로 임상에서 어떠한 영향을 초래하는지에 대한 명확한 예측은 보고된 바 없다. 본 연구에서는 *in vitro*에서 세포독성이 경감된 형태의 MTA를 제조하여, 동물 조직의 염증반응에 대한 영향을 보고자 하였으며, 결과적으로 *in vivo* 상에서 뚜렷한 변화를 초래하지는 않았다. 다만, 실험의 기간이 2주에 한정되어 있고, 연조직에 대한 영향만을 관찰하였기에, 본 연구의 결과만으로 세포독성과 염증반응의 관계를 명확히 하기에는 부족하다. 따라서 이후의 연구에서 다양한 기간을 통하여 경조직에 대한 NAC-MTA의 영향을 관찰할 필요가 있으며, NAC이 MTA 세포독성 감소에 관여하는 기전에 대한 추가적인 규명이 요구된다.

## 참고문헌

- Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J*. 2003;36:225-231.
- Albuquerque MT, Valera MC, Nakashima M, Nör JE, Bottino MC. Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. *J Dent Res* 2014;93:1222-1231.
- Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:355-359.
- Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, Lesot H. Effects of dentin proteins, transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF  $\beta 1$ ) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol* 1992;36:491-503.
- Bessho K, Tanaka N, Matsumoto J, Tagawa T, Murata M. Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 1991;70:171-175.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72: 248-54.
- Camargo SE, Camargo CH, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H,

Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J* 2009;42:227-237.

Camelleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater* 2013;19:580-593.

Camilleri J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2008;41:408-417.

Caturla N, Vera-Samper E, Villalaín J, Mateo CR, Micol V. The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radic Biol Med* 2003;34:648-662.

Chang SW, Baek SH, Yang HC, Seo DG, Hong ST, Han SH, Lee Y, Gu Y, Kwon HB, Lee W, Bae KS, Kum KY. Heavy metal analysis of Ortho MTA and ProRoot MTA. *J Endod* 2011;37:1673-1676.

Epasinghe DJ, Yiu C, Burrow MF. Effect of flavonoids on remineralization of artificial root caries. *Aust Dent J* (in press, doi 0.1111/adj.12367)

Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 2001;17:163-166.

Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF- $\beta$  in human dentin. *J Bone Miner Res* 1990;5:717-723.

Guitierrez-Venegas G, Contreras-Sanchez A. Luteolin fisetin inhibit

the effects of lipopolysaccharide obtained from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. Mol Biol Rep 2013;40:477-485.

Haniastuti T, Nunez P, Djais AA. The role of transforming growth factor beta in tertiary dentinogenesis. Dent J (Maj Ked Gigi) 2008;41:15-20.

Hu J, Du X, Huang C, Fu D, Ouyang X, Yang Y. Antibacterial and physical properties of EGCG-containing glass ionomer cements. J Dent 2013;41:927-934.

Hwang YC, Hwang IN, Oh WM, Park JC, Lee DS, Son HH. Influence of TGF- $\beta$ 1 on the expression of BSP, DSP, TGF- $\beta$ 1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis. J Mol Histol 2008;39:153-160.

Jiao Y, Ma S, Wang Y, Li J, Shan L, Chen J. Epigallocatechin-3-gallate reduces cytotoxic effects caused by dental monomers: A Hypothesis. Med Sci Monit 2015;21:3197-3202.

Jin P, Wu H, Xu G, Zheng L, Zhao J. Epigallocatechin-3-gallate as a pro-osteogenic agent to enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow: an in vitro study. Cell Tissue Res 2014;356:381-390.

Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. J Endod 2000;26:288-291.

Kettering JD, Torabinejad M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 1995;21:537-542.

Khalil I, Naaman A, Camilleri J. Investigation of a novel mechanically mixed mineral trioxide aggregate (MM-MTA<sup>TM</sup>). *Int Endod J* 2015;48:757-767.

Kim JG, Son KM, Park HC, Zhu T, Kwon JH, Yang HC. Stimulating effects of quercetin and phenamil on differentiation of human dental pulp cells. *Eur J Oral Sci* 2013;121:559-565.

Kim M, Yang W, Kim H, Ko H. Comparison of the biological properties of ProRoot MTA, OrthoMTA, and Endocem MTA cements. *J Endod* 2014;40:1649-1653.

Kim NR, Park HC, Kim I, Lim BS, Yang HC. In vitro cytocompatibility of N-acetylcysteine-supplemented dentin bonding agents. *J Endod* 2010; 36:1844-1850.

Koulaouzidou EA, Economides N, Beltes P, Geromichalos G, Papazisis K. In vitro evaluation of the cytotoxicity of ProRoot MTA and MTA Angelus. *J Oral Sci* 2008;50:397-402.

Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. Effects of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol* 2006;22:39-46.

Li C, Xie B. Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant effects of tea catechin oxypolymers. *J Agric Food Chem* 2000;48:6362-6366.

Li F, Liu X, Zhao S, Wu H, Xu HH. Porous chitosan bilayer membrane containing TGF- $\beta$ 1 loaded microspheres for pulp capping and reparative dentin formation in a dog model. *Dent Mater* 2014;30:172-181.

Li Y, Lee IS, Cui FZ, Choi SH. The biocompatibility of nanostructured calcium phosphate coated on micro-arc oxidized titanium. *Biomaterials* 2008;29:2025-2032.

Li Y, Lü X, Sun X, Bai S, Li S, Shi J. Odontoblast-like cell differentiation and dentin formation induced with TGF- $\beta$ 1. *Arch Oral Biol* 2011;56:1221-1229.

Liu D, Zhang X, Jiang L, Guo Y, Zheng C. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) attenuates concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Acta Histochem* 2014;116:654-662.

Lombardo Bedran TB, Palomari Spolidorio D, Grenier D. Green Tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate and cranberry proanthocyanidins act in synergy with cathelicidin (LL-37) to reduce the LPS-induced inflammatory response in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts. *Arch Oral Biol* 2015;60:845-853.

Min KS, Park HJ, Lee SK, Park SH, Hong CU, Kim HW, Lee HH, Kim EC. Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp. *J Endod* 2008;34:666-670.

Minamikawa H, Yamada M, Deyama Y, Suzuki K, Kaga M, Yawaka Y, Ogawa T. Effect of N-acetylcysteine on rat dental pulp cells cultured on mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2011;37:637-641.

Morinobu A, Biao W, Tanaka S, Horiuchi M, Jun L, Tsuji G, Sakai Y, Kurosaka M, Kumagai S. (-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses osteoclast differentiation and ameliorates experimental arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 2008;58:2012-2018.

Nakagawa H, Wachi M, Woo JT, Kato M, Kasai S, Takahashi F, Lee IS, Nagai K. Fenton reaction is primarily involved in a mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate to induce osteoclastic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;292:94-101.

Nakashima M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. *Arch Oral Biol* 1994;39:1085-1089.

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoom DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoid: a reivew of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001;74:418-425.

Oguntebi BR, Heaven T, Clark AE, Pink FE. Quantitative assessment of dentin bridge formation following pulp-capping in miniature swine. *J Endod* 1995;21:79-82.

Oka Y, Iwai S, Amano H, Irie Y, Yatomi K, Ryu K, Yamada S, Inagaki K, Oguchi K. Tea polyphenols inhibit rat osteoclast formation and differentiation. *J Pharmacol Sci* 2012;118:55-64.

Park BJ, Park JC, Taguchi H, Fukushima K, Hyon SH, Takatori K.



Antifungal susceptibility of epigallocatechin 3-O-gallate (EGCg) on clinical isolates of pathogenic yeasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;347:401-405.

Qin W, Lin ZM, Deng R, Li DD, Song Z, Tian YG, Wang RF, Ling JQ, Zhu XF. p38a MAPK is involved in BMP-2-induced odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *Int Endod J* 2012;45:224-233.

Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:258-261.

Rodriguez R, Kondo H, Nyan M, Hao J, Miyahara T, Ohya K, Kasugai S. Implantation of green tea catechin  $\alpha$ -tricalcium phosphate combination enhances bone repair in rat skull defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011;98:263-271.

Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Yavari H, Gaderian A. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. *J Endod* 2006;32:776-780.

Shen X, Zhang Y, Feng Y, Zhang L, Li J, Xie YA, Luo X. Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell growth, induces apoptosis and causes S phase arrest in hepatocellular carcinoma by suppressing the AKT pathway. *Int J Oncol* 2014;44:791-796.

Song D, Gan M, Zou J, Zhu X, Shi Q, Zhao H, Luo Z, Zhang W, Li

S, Niu J, Zhu H, Chen H, Yuan C, Liu X, Yang H. Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate in preventing bone loss in ovariectomized rats and possible mechanisms. *Int J Clin Exp Med* 2014;7:4183-4190.

Song JS, Mante FK, Romanow WJ, Kim S. Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, white ProRoot MTA, and gray MTA-Angelus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:809-815.

Takahashi A, Inoue H, Mishima K, Ide F, Nakayama R, Hasaka A, Ryo K, Ito Y, Sakurai T, Hasegawa Y, Saito I. Evaluation of the effects of quercetin on damaged salivary secretion. *PLoS One* 2015;10:e0116008.

Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995;21:349-353.

Vali B, Rao LG, El-Sohemy A. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *J Nutr Biochem* 2007;18:341-347.

Zhao H, Xie P, Li X, Zhu W, Sun X, Sun X, Chen X, Xing L, Yu J. A prospective phase II trial of EGCG in treatment of acute radiation-induced esophagitis for stage III lung cancer. *Radiother Oncol* 2015;114:351-356.

## Abstract

# **Effects of Antioxidants on Differentiation of Human Dental Pulp Cells and Cytotoxicity of Mineral Trioxide Aggregate**

Young Seok Kim, D.D.S., M.S.D.

Department of Dental Biomaterials Science, Graduate School,  
Seoul National University.

( Directed by Prof. Hyeong-Cheol Yang, Ph.D.)

Dental pulp cells can differentiate into odontoblasts, and are known to play an important role in tertiary dentinogenesis. External stimuli such as a pulp capping treatment can induce tertiary dentinogenesis which include dentin bridge formation. The formation of dentin bridge is important in protecting dental pulp, and clinically considered as a standard for evaluation of biocompatibility of pulp capping agents. This thesis investigated the effects of epigallocatechin gallate (EGCG), a major flavonoid of green tea and red wine, on the differentiation of human dental pulp cells (HDPCs). The growth of HDPC was suppressed by treatment with 60  $\mu$ M EGCG for 5 days. EGCG enhanced ALP activity of HDPC at concentrations ranging from 10 to 30  $\mu$ M. Furthermore, the expression of osteocalcin (OCN) and dentin sialophosphoprotein

(DSPP) mRNA was enhanced by EGCG. Extracellular matrix mineralization was also promoted by EGCG even in the absence of other odontogenic factors such as ascorbic acid and dexamethasone. Therefore, it is certain that EGCG is capable of enhancing odontogenicity of dental pulp cells. EGCG was also successfully incorporated into apatite coats of Ti surface, and increased ALP activity of HDPCs that were cultured on the Ti surface.

The second purpose of this thesis was to investigate the effect of an antioxidant on biocompatibility of MTA. Because EGCG is not hydrophilic, N-acetylcysteine (NAC), a hydrophilic antioxidant, was used for this study. Cytotoxicity of MTA decreased, as the period for MTA hydration increased. Initial cytotoxicity of MTA was attenuated by incorporation of NAC into MTA (NAC-MTA). When MTA and NAC-MTA were subcutaneously implanted in rats for two weeks, fibrous capsules and inflammatory cells such as lymphocytes appeared around the implants. There were no significant differences in the degree of inflammatory responses between MTA and NAC-MTA.

-----  
Keywords : Dental pulp cell, Odontogenic differentiation,  
Antioxidant, Epigallocatechin gallate, N-acetylcysteine,  
Mineral trioxide aggregate

Student number: 2012-31195